

Juliana Cavalli

**PAPEL DOS GLICOCORTICOIDES NO CONDICIONAMENTO
OLFATÓRIO AVERSIVO PROMOVIDO PELO
PENTILENOTETRAZOL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Coorientador: Prof. Dr. Leandro José Bertoglio

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cavalli, Juliana

PAPEL DOS GLICOCORTICOIDES NO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO
AVERSIVO PROMOVIDO PELO PENTILENOTETRAZOL / Juliana
Cavalli ; orientador, Antônio de Pádua Carobrez ; co-
orientador, Leandro José Bertoglio. - Florianópolis, SC,
2013.

116 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. condicionamento olfatório aversivo.
3. condicionamento contextual aversivo. 4.
pentilenotetrazol. 5. dexametasona. I. Carobrez, Antônio de
Pádua. II. Bertoglio, Leandro José. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia. IV. Título.

**“PAPEL DOS GLICOCORTICÓIDES NO
CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO
AVERSIVO PROMOVIDO PELO
PENTILENOTETRAZOL”**

por

Juliana Cavalli

Tese julgada e aprovada em sua forma final
pelos membros titulares da Banca Examinadora
(Port. 12/PPGFMC/2013) do Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia - UFSC, composta
pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



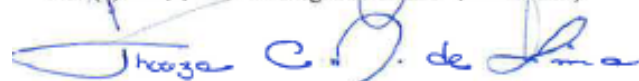
Prof(a). Dr(a). Antônio de Pádua Carobrez
(Presidente/Orientador/FMC/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Raquel Vecchio Fornari (UFABC)



Prof(a). Dr(a). Hélio Zangrossi Junior (FMC/USP)



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima
(FMC/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Cilene Lino de Oliveira (CFS/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro De Lima
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 05 de abril de 2013.

À minha mãe, Tereza Pizzolatto Cavalli,

Ao meu pai, Sergio Antônio Cavalli,

À minha irmã, Daiana Cavalli,

Ao meu amor, Martín Augusto Gagliotti Vigil.

Este trabalho eu dedico a vocês!

AGRADECIMENTOS

Dizer limita.

Palavras não são capazes de compor tudo que cabe no verdadeiro sentido da palavra gratidão.

Portanto, restam-me apenas poucas linhas voltadas a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Ao professor e orientador, Antônio de Pádua Carobrez, pela oportunidade de viver toda a etapa da minha pós-graduação em seu laboratório. Pelos ensinamentos, compreensão e paciência.

Ao professor e coorientador, Leandro José Bertoglio, pela prontidão em me ajudar, atenção e amizade em todos os momentos.

Aos professores doutores Cilene Lino de Oliveira, Hélio Zangrossi Junior, Raquel Vecchio Fornari, Rui Daniel Schröder Prediger e Thereza Christina Monteiro de Lima por aceitarem o convite para compor a banca examinadora e contribuírem cientificamente com este trabalho.

Aos atuais colegas do Laboratório de Neurobiologia Comportamental, Juliana Kroon, Karina Sobota, Franklin Back, Cristiane Mochny e Camila Zanella e, aos veteranos que já finalizaram suas etapas neste laboratório, Rimenez Souza, Grasielle Kincheski, Fabrício Do-Monte, Eloisa Pavesi, Ronan Martins, Tatiana Perez, Taiane Medeiros e Natayme Rocha, por tornarem essa trajetória mais prazerosa, divertida e completamente inesquecível.

Aos demais colegas e servidores desse Departamento, em especial os colegas e amigos Alexandre Hoeller, Lenyta Gomes e Silvia DalBó, pelas colaborações dadas a este trabalho.

Às minhas amigas-irmãs, Monique Mistura, Aline Zonta, Marina Meneguzzo, Francine Dacroce, Juliana Valandro e Priscila Rodrigues, por mostrarem-me que uma vez estabelecido o laço da amizade verdadeira, ele não se desfaz.

Aos meus pais, Sergio A. Cavalli e Tereza P. Cavalli, por me apoiarem e estarem ao meu lado em qualquer momento da vida. Por serem esses exemplos de caráter e honestidade. É a vocês que devoto meu amor eterno.

À minha irmã, Daiana Cavalli, que compartilhou comigo o cotidiano durante todo esse percurso e que, pelo seu jeito de ser bastante diferente do meu, me faz perceber outras formas de encarar um mesmo evento. Levo-te comigo pra sempre.

Ao meu amor, Martín A. G. Vigil, por ser meu maior cúmplice. Por aceitar junto comigo o desafio de transpor a distância e fazer o amor prevalecer. A ti, eu só tenho a agradecer. Amo-te.

Aos meus tios e tias que não tiveram a mesma oportunidade que tive de alcançar o ensino superior. Sintam-se parte integrante deste título junto comigo.

Às agências brasileiras de fomento, CAPES e CNPq, por financiarem este trabalho e tornarem possível sua realização.

Enfim, a todos aqueles que colaboraram e/ou me incentivaram pra que eu conseguisse alcançar o ponto final, fica o meu sincero agradecimento.

“Só há um princípio motor: a faculdade de desejar”.
Aristóteles

RESUMO

Quando organismos entram em contato com uma fonte de perigo, uma ameaça ou uma situação desagradável, mecanismos comportamentais e neuroendócrinos de defesa são ativados para proteger e reduzir possíveis danos ao indivíduo. Após um evento estressante, hormônios como a corticosterona são liberados em grandes quantidades, modulando processos de memória e aprendizado relacionados ao evento traumático. Concentrações muito baixas de corticosterona também têm demonstrado interferir nos processos de formação e expressão de memórias aversivas. Para compreender os mecanismos envolvidos na formação e expressão destas memórias, muitos estudos têm utilizado condicionamentos aversivos como modelo experimental. No presente estudo, o pentilenotetrazol (PTZ) foi empregado como um estímulo aversivo relevante (estímulo incondicionado; EI) e apresentado em associação com um odor neutro (estímulo condicionado 1; EC1) para promover o condicionamento olfatório aversivo (COA). Desta forma, o propósito do presente estudo foi verificar o papel do glicocorticoide exógeno, dexametasona, na formação e na expressão da memória aversiva condicionada ao odor (condicionamento de 1ª ordem) promovida pelo PTZ e condicionada ao contexto (condicionamento de 2ª ordem) promovida pelo odor condicionado. Para isto, a dexametasona, um agonista seletivo dos receptores glicocorticoides (GR), foi administrada 60 min antes da aquisição e da expressão do COA e/ou do condicionamento contextual aversivo (CCA). Os resultados obtidos demonstraram que os níveis baixos de corticosterona, induzidos pela supressão do eixo HPA por dexametasona, foram capazes de prejudicar tanto a formação como a expressão da memória aversiva condicionada ao odor. Entretanto, embora a dexametasona tenha prejudicado a formação da memória contextual aversiva, a dexametasona não foi capaz de impedir a expressão da resposta defensiva frente ao contexto condicionado. Ainda, quando o CCA já foi estabelecido e a dexametasona foi administrada antes da expressão da resposta defensiva condicionada ao contexto, não se observou quaisquer prejuízos na expressão da resposta defensiva frente ao contexto. Entretanto, ao se injetar dexametasona 60 min antes da aquisição e da expressão do CCA (condicionamento de 2ª ordem), a expressão da resposta defensiva relacionada ao contexto condicionado (teste EC2) foi prejudicada. Assim, o presente trabalho demonstrou que a dexametasona é capaz de prejudicar a aquisição/formação e a expressão da memória olfatória aversiva promovida pelo PTZ. Entretanto, o prejuízo na expressão da

resposta defensiva relacionada ao contexto condicionado (condicionamento de 2ª ordem) foi observado apenas quando a dexametasona foi administrada antes da aquisição e da expressão da memória contextual aversiva, evidenciando diferenças sutis entre o processamento da memória aversiva de 1ª e 2ª ordem neste modelo experimental.

Palavras-chave: condicionamento olfatório aversivo; condicionamento aversivo interoceptivo; condicionamento aversivo de segunda ordem; pentilenotetrazol; glicocorticoides; dexametasona.

ABSTRACT

When organisms are in contact with a source of danger, threat or unpleasant situation, behavioral and neuroendocrine mechanisms of defense are activated to prevent injuries. After a stressful event, hormones such as corticosterone (CORT) are released in high amounts, modulating learning and memory processes related to the traumatic event. As well as high levels, low levels of CORT have been demonstrated to interfere with the encoding and expression processes of aversive memories. To study the mechanisms involved in these processes, several studies have used fear conditioning as experimental model. In the present study, the pentylene-tetrazole (PTZ) was utilized as an aversive interoceptive stimulus (US) and it was presented in association with a neutral odor (conditioned stimulus 1; CS1) to promote olfactory fear conditioning (OFC). Thus, the present study was delineated to verify the CORT's role in the formation and in the expression of an olfactory aversive memory (first-order conditioning) promoted by PTZ and in the context aversive memory (second-order conditioning) promoted by the conditioned odor. To test it, dexamethasone, a selective glucocorticoid receptor (GR) agonist, was administered 60 min before the acquisition and/or the expression of the OFC and the contextual fear conditioning (CFC). The results showed that the low levels of CORT, induced by dexamethasone's HPA axis suppression, were able to impair the encoding and the expression of the olfactory aversive memory. However, despite of contextual aversive memory encoding, dexamethasone was not able to prevent the defensive response expression related to the conditioned context (second-order conditioning) in the CS2 test. In addition, when the CFC was already established and the dexamethasone was administered before the expression of the defensive response related to the conditioned context, the dexamethasone was not able to impair the defensive responses expression related to the context. Otherwise, when the HPA axis suppression was induced by dexamethasone and the CORT's levels were reduced before the acquisition and the expression of CFC (second-order conditioning), the expression of the defensive response related to the conditioned context (CS2 test) was impaired. Thus, the present study showed that the acquisition/formation and the expression of an olfactory aversive memory were impaired by the dexamethasone effect. Regarding to the context aversive memory expression, only when dexamethasone was administered before the acquisition and the expression of CFC, the defensive response related to the conditioned

context (CS2 test) was impaired. Altogether, the results evidenced subtle differences regarding to the glucocorticoid modulation in each order of fear conditioning (OFC - first-order conditioning, elicited by PTZ and, CFC - second-order conditioning, elicited by the conditioned odor).

Keywords: olfactory fear conditioning; interoceptive fear conditioning; second-order fear conditioning; pentylentetrazole; glucocorticoid; dexamethasone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.: Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)	32
Figura 2.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a avaliação do condicionamento olfatório e contextual aversivo.....	48
Figura 3.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a avaliação dos registros eletroencefalográficos antes e após a administração sistêmica de PTZ.....	50
Figura 4.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a avaliação dos parâmetros cardiovasculares antes e após a administração sistêmica de PTZ	51
Figura 5.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a dosagem da glicemia após a administração sistêmica de salina ou PTZ.....	52
Figura 6.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a avaliação da corticosterona plasmática após a administração sistêmica de salina ou PTZ.....	54
Figura 7.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a avaliação do efeito do veículo ou Dex sob a aquisição do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo PTZ.....	55
Figura 8.: Desenho do procedimento experimental utilizado para dosagem de corticosterona plasmática na aquisição do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo PTZ após a administração de veículo ou Dex.	56
Figura 9.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a avaliação do efeito do veículo ou Dex sob a expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo PTZ e sob a aquisição do condicionamento contextual aversivo (2ª ordem) promovido pelo odor condicionado.....	57
Figura 10.: Desenho do procedimento experimental utilizado para dosagem de corticosterona plasmática na expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo PTZ após a administração de veículo ou Dex.	58
Figura 11.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a avaliação do efeito do veículo ou Dex sob a expressão do condicionamento contextual aversivo (2ª ordem) promovido pelo odor condicionado.	59
Figura 12.: Desenho do procedimento experimental utilizado para dosagem de corticosterona plasmática na expressão do condicionamento contextual aversivo promovido pelo odor condicionado (2ª ordem) após a administração de veículo ou Dex.....	60

Figura 13.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a avaliação do efeito do veículo ou Dex sob a expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo PTZ e sob a expressão do condicionamento contextual aversivo (2ª ordem) promovido pelo odor condicionado	62
Figura 14.: Avaliação da resposta defensiva nas sessões de teste EC1 e teste EC2 de ratos injetados com salina ou PTZ 10 ou 30 min antes da sessão de condicionamento olfatório com acetato de amila.....	64
Figura 15.: Avaliação do registro eletroencefalográfico no córtex e hipocampo de ratos Long Evans <i>hooded</i> tratados via i.p. com PTZ.....	66
Figura 16.: Monitoramento cardíaco [frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM)] ao longo de 30 min em ratos anestesiados e injetados com PTZ	67
Figura 17.: Dosagem da glicemia de ratos injetados com salina ou PTZ imediatamente após o condicionamento olfatório aversivo.	68
Figura 18.: Dosagem da corticosterona plasmática de ratos injetados com salina ou PTZ após 30 min do condicionamento olfatório aversivo	69
Figura 19.: Avaliação da resposta defensiva nas sessões de teste EC1 e teste EC2 de ratos injetados com PTZ 10 min e com Dex 60 antes da sessão de condicionamento olfatório com acetato de amila.....	71
Figura 20.: Efeito do veículo ou da Dex sob a dosagem de corticosterona plasmática de ratos condicionados ao odor de acetato de amila com salina ou PTZ – Dia 2.....	73
Figura 21.: Avaliação da resposta defensiva nas sessões de teste EC1 e teste EC2 de ratos injetados com PTZ 10 min antes da sessão de condicionamento olfatório com acetato de amila e com veículo ou Dex 60 min antes do teste EC1.....	76
Figura 22.: Efeito da Dex sob a dosagem de corticosterona plasmática de ratos condicionados ao odor de acetato de amila com salina ou PTZ – Dia 4.....	78
Figura 23.: Avaliação da resposta defensiva nas sessões de teste EC1 e teste EC2 de ratos injetados com PTZ 10 min antes da sessão de condicionamento olfatório com acetato de amila e com veículo ou Dex 60 min antes do teste EC2.....	80
Figura 24.: Efeito da Dex sob a dosagem de corticosterona plasmática de ratos condicionados ao odor de acetato de amila com salina ou PTZ – Dia 5.....	82
Figura 25.: Avaliação da resposta defensiva nas sessões de teste EC1 e teste EC2 de ratos injetados com PTZ 10 min antes da sessão de	

condicionamento olfatório com acetato de amila e com veículo ou Dex 60 min antes do teste EC1 e EC2.	86
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico
AP: antero-posterior
AVP: arginina-vasopressina
BHE: barreira hemato-encefálica
BLA: amígdala basolateral
CCA 1: córtex cingulado anterior 1
CCA: condicionamento contextual aversivo
COA: condicionamento olfatório aversivo
CRH: hormônio liberador de corticotrofina
Dex: dexametasona
DV: dorso-ventral
EC1: estímulo condicionado 1 ou de 1ª ordem
EC2: estímulo condicionado 2 ou de 2ª ordem
EC1-EC2: condicionamento aversivo entre o EC1 e o 2º estímulo neutro (EC2)
EEG: eletroencefalograma
EI: estímulo incondicionado
EI-EC1: condicionamento aversivo entre o EI e o 1º estímulo neutro (EC1)
Eixo HPA: eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
EN: estímulo neutro
EN2: estímulo neutro 2 ou 2º estímulo neutro
FC: frequência cardíaca
GABA: ácido gama-aminobutírico
GR: receptor glicocorticóide
LCE: labirinto em cruz elevado
LTM: memória de longa duração
MC2-R: receptores de melanocortina tipo 2
MCPd: matéria cinzenta periaquedutal dorsal
MCPdl: matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral
ML: médio-lateral
MR: receptor mineralocorticóide
PAM: pressão arterial média
PMd: núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo
PTZ: pentilenotetrazol
PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo
RC: resposta condicionada
REC: resposta emocional condicionada
RNA: ácido ribonucleico

STM: memória de curta duração

TEPT: transtorno de estresse pós-traumático

VP: vasopressina

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	25
1.1 COMPORTAMENTO DEFENSIVO	25
1.2 CONDICIONAMENTO CLÁSSICO OU PAVLOVIANO E FASES DE FORMAÇÃO DA MEMÓRIA.....	26
1.3 CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO AVERSIVO (COA).....	28
1.4 ESTRESSE E MEMÓRIA	30
1.4.1 Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.....	31
1.4.2 Glicocorticoides	33
II. HIPÓTESE	39
III. OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
IV. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 ANIMAIS.....	43
4.2 DROGAS	43
4.3 MODELO DO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO E CONTEXTUAL AVERSIVO.....	44
4.4 PROCEDIMENTOS	47
4.4.1 ETAPA I: Validação estendida do modelo do condicionamento olfatório e contextual aversivo promovido pelo pentilenotetrazol em ratos Long Evans hooded	47
4.4.1.1 Experimento 1: Avaliação comportamental do modelo de condicionamento olfatório aversivo utilizando o pentilenotetrazol como estímulo incondicionado	47
4.4.1.2 Experimento 2: Avaliação do registro eletroencefalográfico após a administração sistêmica de pentilenotetrazol	48
<i>4.4.1.2.1 Registros eletroencefalográficos (EEG).....</i>	<i>48</i>
4.4.1.3 Experimento 3: Avaliação dos parâmetros cardiovasculares após a administração sistêmica de pentilenotetrazol (PTZ).....	50
<i>4.4.1.3.1 Monitoramento Cardíaco.....</i>	<i>50</i>
4.4.1.4 Experimento 4: Avaliação da glicemia após a administração sistêmica de pentilenotetrazol	52
4.4.1.5 Experimento 5: Avaliação da corticosterona plasmática após a administração de pentilenotetrazol.....	53
4.4.2 ETAPA II: Efeito da administração do agonista GR, dexametasona, na aquisição do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol	55

4.4.2.1 Experimento 6: Avaliação do efeito da dexametasona sob a aquisição do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol.....	55
4.4.2.2 Experimento 7: Avaliação da corticosterona plasmática após a injeção de dexametasona na aquisição do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol.....	56
4.4.3 ETAPA III: Efeito da administração do agonista GR, dexametasona, na expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol e na aquisição do condicionamento contextual de 2ª ordem.....	57
4.4.3.1 Experimento 8: Avaliação comportamental da dexametasona na expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol e na aquisição do condicionamento contextual aversivo de 2ª ordem	57
4.4.3.2 Experimento 9: Avaliação da corticosterona plasmática após a injeção de dexametasona na expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol e na aquisição do condicionamento contextual aversivo de 2ª ordem.....	58
4.4.4 ETAPA IV: Efeito da administração do agonista GR, dexametasona, na expressão do condicionamento contextual aversivo de 2ª ordem.....	59
4.4.4.1 Experimento 10: Avaliação comportamental da dexametasona na expressão condicionamento contextual aversivo (CCA) de 2ª ordem ..	59
4.4.4.2 Experimento 11: Avaliação da corticosterona plasmática após a injeção de dexametasona na expressão do condicionamento contextual aversivo de 2ª ordem.....	60
4.4.5 ETAPA V: Efeito da administração do agonista GR, dexametasona, na expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol e na expressão do condicionamento contextual de 2ª ordem.....	61
4.4.5.1 Experimento 12: Efeito comportamental da dupla administração de dexametasona na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na expressão do condicionamento contextual de 2ª ordem.....	61
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
V. RESULTADOS.....	63
5.1 ETAPA I: VALIDAÇÃO ESTENDIDA DO MODELO DO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO E CONTEXTUAL AVERSIVO PROMOVIDO PELO PENTILENOTETRAZOL EM RATOS LONG EVANS HOODED	63

5.1.1 Experimento 1: Avaliação comportamental do modelo de condicionamento olfatório aversivo utilizando o pentilenotetrazol como estímulo incondicionado	63
5.1.2 Experimento 2: Avaliação do registro eletroencefalográfico após a administração sistêmica de pentilenotetrazol	65
5.1.3 Experimento 3: Avaliação dos parâmetros cardiovasculares após a administração sistêmica de pentilenotetrazol	67
5.1.4 Experimento 4: Avaliação da glicemia após a administração sistêmica de pentilenotetrazol.....	67
5.1.5 Experimento 5: Avaliação da corticosterona plasmática após a administração de pentilenotetrazol.....	68
5.2 ETAPA II: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO AGONISTA GR, DEXAMETASONA, NA AQUISIÇÃO DO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO AVERSIVO PROMOVIDO PELO PENTILENOTETRAZOL	69
5.2.1 Experimento 6: Avaliação do efeito da dexametasona sob a aquisição do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol.....	69
5.2.2 Experimento 7: Avaliação da corticosterona plasmática após a injeção de dexametasona na aquisição do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol	72
5.3 ETAPA III: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO AGONISTA GR, DEXAMETASONA, NA EXPRESSÃO DO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO AVERSIVO PROMOVIDO PELO PENTILENOTETRAZOL E NA AQUISIÇÃO DO CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL DE 2ª ORDEM.....	74
5.3.1 Experimento 8: Avaliação comportamental da dexametasona na expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol e na aquisição do condicionamento contextual aversivo de 2ª ordem	74
5.3.2 Experimento 9: Avaliação da corticosterona plasmática após a injeção de dexametasona na expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol e na aquisição do condicionamento contextual aversivo de 2ª ordem.....	77
5.4 ETAPA IV: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO AGONISTA GR, DEXAMETASONA, NA EXPRESSÃO DO CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL AVERSIVO DE 2ª ORDEM	79
5.4.1 Experimento 10: Avaliação comportamental da dexametasona na expressão condicionamento contextual aversivo (CCA) de 2ª ordem.....	79

5.4.2 Experimento 11: Avaliação da corticosterona plasmática após a injeção de dexametasona na expressão do condicionamento contextual aversivo de 2ª ordem	81
5.5 ETAPA V: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO AGONISTA GR, DEXAMETASONA, NA EXPRESSÃO DO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO AVERSIVO PROMOVIDO PELO PENTILENOTETRAZOL E NA EXPRESSÃO DO CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL DE 2ª ORDEM.....	83
5.5.1 Experimento 12: Efeito comportamental da dupla administração de dexametasona na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na expressão do condicionamento contextual de 2ª ordem	83
VI. DISCUSSÃO	87
VII. SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS	95
VIII. CONCLUSÃO	97
IX. REFERÊNCIAS	99
ANEXO A	115

I. INTRODUÇÃO

1.1 COMPORTAMENTO DEFENSIVO

As respostas emocionais a situações aversivas, constrangedoras ou ameaçadoras são bastante comuns em seres humanos e possuem grande importância para os indivíduos. Neste contexto, quando a ansiedade se encontra dentro do limiar da normalidade e ocorre em situações apropriadas, ela serve como um estímulo vital que motiva a realização de novas vivências, funções e desafios (HETEM & GRAEFF, 1997). Em contrapartida, em certos momentos os sintomas da ansiedade podem se tornar exagerados, recorrentes ou começar a ocorrer em situações inadequadas, caracterizando o estado de doença ou transtornos de ansiedade (LEDOUX, 1998).

Para se estudar as bases neurobiológicas que delineiam os processos envolvidos nestas emoções como a ansiedade e o medo, muitos cientistas se utilizam dos princípios que compõem as raízes evolutivas destas emoções. Neste sentido, o medo e a ansiedade têm raízes nas reações de defesa dos animais, desencadeadas frente a estímulos que representam perigo ou ameaça à sobrevivência, ao bem estar ou à integridade física das diferentes espécies (HETEM & GRAEFF, 1997). Blanchard & Blanchard (1971; 1972; 1989) descreveram em detalhes padrões defensivos de ratos selvagens e de laboratório em resposta à exposição ao predador ou a estímulos relacionados a este, como o odor de gato. Nesta situação, quando esses animais são expostos a situações aversivas ou encontram-se sob ameaça, as estratégias comportamentais observadas vão desde fuga e imobilidade até ataque defensivo e submissão (BLANCHARD, YUDO et. al., 1993). Tais ameaças permitem uma análise mais detalhada dos comportamentos de defesa inata e das situações em que elas ocorrem. Todavia, assim como no medo inato, as mesmas respostas defensivas podem ser observadas frente a estímulos ameaçadores aprendidos. Este fenômeno acontece quando um estímulo previamente neutro adquire propriedades aversivas após ser devidamente associado/condicionado a um evento aversivo (KIM & JUNG, 2006). É dessa forma que experiências aversivas são facilmente aprendidas e possuem a característica inerente de perdurarem por um longo período. Por esse motivo é que o condicionamento aversivo tem se tornado um modelo importante e muito utilizado na elucidação dos mecanismos cognitivos e

neurais envolvidos frente a situações ou estímulos aversivos (FENDT & FANSELOW, 1999).

1.2 CONDICIONAMENTO CLÁSSICO OU PAVLOVIANO E FASES DE FORMAÇÃO DA MEMÓRIA

O estudo do condicionamento Clássico ou Pavloviano teve início em 1927 com o fisiologista russo Ivan Petrovich Pavlov. Dentre suas contribuições para o universo científico, o experimento que observou o reflexo da salivação em cães condicionados ao som de uma campainha (estímulo condicionado) com a apresentação de alimento (estímulo incondicionado; EI - PAVLOV, 1927) foi responsável por impulsionar estudos subsequentes que se utilizam deste fundamento associativo como modelo experimental. Para o estudo das emoções como a ansiedade e o medo, o EI possui natureza aversiva. Assim, após uma ou mais apresentações, um estímulo emocionalmente neutro adquire a capacidade de gerar respostas defensivas que, anteriormente ao condicionamento, ocorriam apenas na presença do EI. A expressão desta resposta defensiva indica o sucesso do condicionamento e evidencia que o estímulo neutro tornou-se um estímulo condicionado, neste caso, de 1ª ordem (EC1; GEWIRTZ & DAVIS, 2000). De maneira semelhante, para que o condicionamento Pavloviano aversivo de 2ª ordem se estabeleça, a existência de um momento associativo entre os estímulos também é necessária. No entanto, nesta ordem de condicionamento o segundo estímulo emocionalmente neutro é condicionado ao EC1, tornando-se um estímulo condicionado de 2ª ordem (EC2).

Dentre as características comuns entre o condicionamento aversivo de 1ª e 2ª ordem está o valor motivacional aversivo. No caso do condicionamento de 1ª ordem, o EI possui valor motivacional aversivo intrínseco e o EC1 valor motivacional aversivo adquirido. Em ambos os casos, para que o condicionamento se estabeleça, o EC1 deve possuir valor motivacional aversivo adquirido tão relevante quanto o intrínseco (GEWIRTZ & DAVIS, 2000). Entretanto, embora o condicionamento aversivo de 1ª e 2ª ordem apresentem características comuns, há também há também características incomuns. Uma delas é a transitoriedade. Enquanto a resposta defensiva aumenta com o maior número de associações entre EI-EC1 no condicionamento aversivo de 1ª ordem, a resposta defensiva decresce com o aumento das associações no condicionamento aversivo de 2ª ordem. Por este motivo, para que o condicionamento de 2ª ordem ocorra, normalmente poucas sessões de condicionamento são realizadas. Uma explicação para essa característica

no condicionamento de 2ª ordem é o desenvolvimento da inibição condicionada (HERENDEEN & ANDERSON, 1968; RESCORLA, 1973; HOLLAND & RESCORLA, 1975; YIN, BARNET et. al., 1994), marcada pela não ocorrência de reforço punitivo aversivo (parte intrínseca do EI) e inibição da emissão das respostas condicionadas (GEWIRTZ & DAVIS, 2000).

Muitas são as respostas emocionais quantificáveis capazes de mostrar que o condicionamento aversivo se estabeleceu. Podem ser citadas como exemplos as alterações de comportamentos defensivos (imobilidade, esquia inibitória e avaliação de risco), as alterações autonômicas (pressão arterial e frequência cardíaca), alterações endócrinas (liberação de hormônios como a corticosterona) e a expressão de reflexos (sobressalto potencializado pelo medo; LEDOUX, 2000). Para que uma resposta defensiva seja expressa frente a um estímulo aversivo aprendido, uma memória (neste caso, aversiva) de longo prazo teve de ser sintetizada. Em termos fisiológicos, memória é a habilidade de um organismo armazenar, reter, atualizar e evocar informações e experiências. Muitos estudos na literatura vêm demonstrando que a memória é um fenômeno cerebral complexo, o qual além de não se restringir a uma única região cerebral, também ocorre de acordo com o tipo de memória em questão (MOHS, 2007; ROEDIGER III, DUDAI et al., 2007).

Aprendizagem e memória são fenômenos interligados que incluem diferentes estágios e processos. Esses fenômenos envolvem desde uma adaptação de curto prazo [memória de curta duração, *short term memory* (STM)] até uma representação da memória de longo prazo [memória de longa duração, *long term memory* (LTM); KUJALA & NÄÄTÄNEN, 2010]. Com base nas suas características, os processos de memória podem ser divididos em fases, que compreendem: aquisição, consolidação, evocação, reconsolidação e extinção (GARAKANI, MATHEW, et al., 2006). Com relação à memória de caráter emocional de longa duração, a aquisição é a fase inicial do aprendizado, seguida da fase de consolidação. Nesta, a memória de curta duração, que iniciou sua formação na etapa de aquisição, é convertida em memória de longa duração através da síntese de proteínas. Uma vez consolidada, a memória de longa duração pode ser acessada a qualquer momento através da evocação, fenômeno que consiste em localizar a informação desejada nas memórias de longo prazo já armazenadas, tornando-a passível de expressão. Portanto, a expressão da memória compreende a recuperação e, por consequência, a tradução desta associação numa

resposta comportamental apropriada (PEZZE & FELTON, 2004; GARAKANI, MATHEW et al., 2006).

Considerando a importância do EI para o estabelecimento do condicionamento aversivo, dois tipos de estímulos podem ser utilizados com este fim: 1) estímulos exteroceptivos, que incluem a exposição a situações de conflito ou choques elétricos inescapáveis; e 2) estímulos interoceptivos, que incluem os tratamentos com drogas ansiogênicas e estimulação de áreas cerebrais específicas (LAL & EMMETT-OGLESBY, 1983), entre outros (GROSS & CANTERAS, 2012). Neste trabalho, o pentilenotetrazol (PTZ) foi selecionado como EI com base no seu efeito ansiogênico em baixas doses através do modelo do condicionamento olfatório previamente padronizado (CAVALLI, BERTOGLIO et al., 2009).

O PTZ é uma droga é um antagonista do receptor $GABA_A$ que foi inicialmente descrito como droga convulsivante em humanos. Posteriormente, se verificou efeitos como ansiedade intensa e ataques de pânico em doses subconvulsivantes e convulsivantes, respectivamente (RODIN, 1958; RODIN & CALHOUN, 1970; SCHENBERG et. al., 2001). Em animais, o PTZ tem sido amplamente utilizado em modelos de ansiedade, sendo considerado um protótipo de droga ansiogênica (LAL & EMMETT-OGLESBY, 1983; JUNG, LAL & GATCH, 2002). Entre os vários efeitos do PTZ, um deles são os efeitos discriminativos (animais de laboratório são capazes de aprender a discriminar o estímulo PTZ do estímulo salina através do comportamento de pressionar uma alavanca; para revisão: JUNG, LAL et al., 2002) que, também é considerado um modelo animal de ansiedade. Neste modelo, o estímulo PTZ sofre modulação através dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₃, NMDA, glicina e ligantes do canal de cálcio tipo L. Devido a diversos compostos também possuírem seu sítio de ação no receptor $GABA_A$, tais como benzodiazepínicos, etanol e fenciclidina e, na sua retirada, alguns destes compostos causarem síndrome de abstinência, há autores que sugerem que o efeito ansiogênico causado pelo PTZ possa ser a manifestação generalizada da síndrome de abstinência (JUNG, LAL & GATCH, 2002).

1.3 CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO AVERSIVO (COA)

Assim como o EI é de suma importância para o estabelecimento do condicionamento aversivo, uma vez que este é o estímulo promotor do aprendizado aversivo, o EC1 olfatório também possui valor significativo, visto sua relevância para os roedores. Neste sentido, a

utilização de pistas olfatórias no condicionamento aversivo vem sendo foco de interesse neste laboratório há vários anos (CANTERAS, KROON et al., 2008; DO-MONTE, CANTERAS et al., 2008; KROON & CAROBREZ, 2009; CAVALLI, BERTOGLIO et al., 2009; PAVESI, CANTERAS et al., 2011; KINCHESKI, MOTA-ORTIZ et al., 2012). Em roedores, este sistema é dotado de dois epitélios quimiossensoriais diferentes. O epitélio olfatório sensorial *principal*, responsável por detectar diferenças odoríferas sutis dentre a diversidade de estímulos, e o epitélio olfatório sensorial *acessório*, mais comumente relacionado à comunicação inter e intra-específica (BRENNAN & KEVERNE, 1997; RESTREPO, ARELLANO et al., 2004). Entretanto, embora cada epitélio possua características próprias, evidências na literatura demonstram que ambos os epitélios parecem interagir de maneira integrada na detecção de odores comuns e feromônios (BRENNAN & KEVERNE, 1997; XU, SCHAEFER et al., 2005; SWANEY & KEVERNE, 2009). Em humanos, a relevância biológica deste sistema sensorial parece se encontrar inserida principalmente nas pistas olfatórias que remeteram às lembranças de eventos traumáticos. Veteranos de guerra com transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) mostraram que o odor de diesel, associado ao evento traumático vivido nos campos de batalha, foi capaz promover a evocação da memória aversiva relacionada a essa experiência aversiva (VERMETTEN, SCHMAHL et al., 2007).

O sistema olfatório dos roedores, além de ser essencial para a identificação individual entre as espécies, interação social, reprodução, alimentação, detecção da presença de predadores, entre outras funções (RESTREPO, ARELLANO et al., 2004; CANTERAS, KROON et al., 2008), também é decisivo no controle do comportamento. Evidências demonstram que o aprendizado olfatório é dotado de características particulares em relação à aquisição, retenção e extinção (SLOTNICK, 2001) de uma memória e parece ser o único sistema sensorial capaz de ativar o circuito defensivo hipotalâmico medial, o qual está diretamente relacionado com as respostas aversivas inatas (CANTERAS, 2002; CANTERAS & BLANCHARD, 2008; CANTERAS, KROON et al., 2008). Com relação à utilização de estímulos olfatórios na promoção de condicionamentos aversivos, muitos trabalhos vêm se utilizando este estímulo sensorial como pista (estímulo condicionado). Respostas robustas e duradouras de congelamento frente a pistas olfatórias previamente condicionadas com choques nas patas têm sido descritas por Otto e colaboradores (1997; 2000). Além das respostas de congelamento, também se observou que estímulos olfatórios são

estímulos condicionados efetivos para a potencialização da resposta de sobressalto (RICHARDSON, VISHNEY et al., 1999; PASCHALL & DAVIS, 2002).

Nos últimos anos, nosso laboratório vem mostrando que o COA é uma ferramenta útil para estudar o sistema defensivo, uma vez que o modelo que vem sendo utilizado é capaz de mimetizar a participação de áreas cerebrais envolvidas com estímulos relacionados ao predador, como o núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (PMd; CANTERAS, KROON et al., 2008) e a matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl; KINCESKI, MOTA-ORTIZ et al., 2012), além de possibilitar o emprego EIs exteroceptivos, como o choque nas patas (KROON & CAROBREZ, 2009) e EIs interoceptivos, como drogas ansiogênicas (CAVALLI, BERTOGLIO et al., 2009) e β -adrenérgicas (PAVESI, CANTERAS et al., 2011). Recentemente, Souza (2011) mostrou a participação dos dois subtipos de receptores esteroides (MR e GR) no COA promovido com choques nas patas. Neste estudo, o autor observou que o momento da administração da dexametasona (Dex), agonista GR, foi crucial para a facilitação ou prejuízo do condicionamento olfatório aversivo e, a partir desses resultados prévios, que o presente trabalho abordará o papel do estresse no condicionamento olfatório e contextual aversivo promovido pelo PTZ.

1.4 ESTRESSE E MEMÓRIA

Uma vez em contato com uma fonte de perigo, ameaça ou situação desagradável, é normal que os organismos recrutem mecanismos comportamentais e neuroendócrinos de defesa para promover sua proteção. Assim, uma vez detectada a ameaça, o sistema sensorial ativado envia esta informação para um grupo de neurônios localizados no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) que, por sua vez, secreta o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), outro hormônio (a vasopressina, VP, ou arginina-vasopressina, AVP) e neuropeptídeos que irão desempenhar suas funções nos sistemas simpático e no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). O eixo HPA, por sua vez, possui grande importância na regulação e controle de aspectos tanto comportamentais como cognitivos e, através da ação do hormônio glicocorticoide (cortisol em humanos/corticosterona em roedores), sinaliza estados de estresse capaz de afetar os processos de memória (McEWEN, 2003).

1.4.1 Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

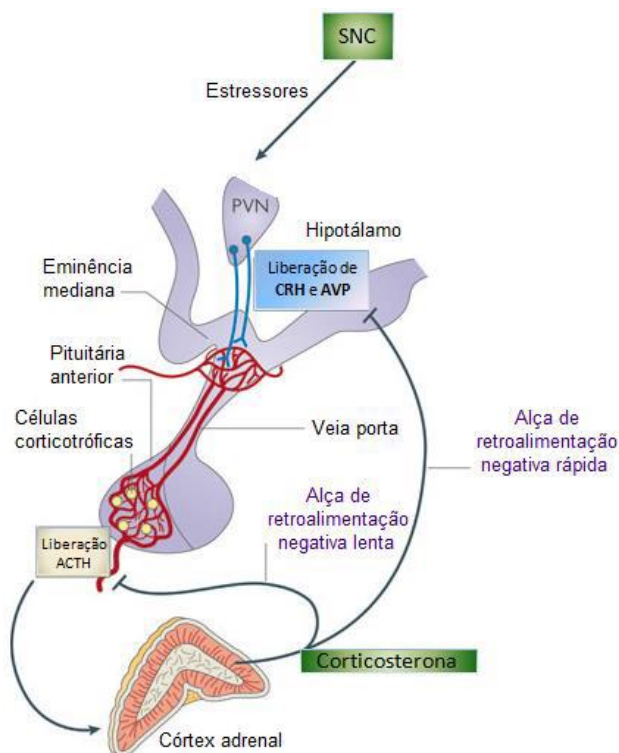
A ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) começa com a liberação de CRH pelo PVN no hipotálamo. Os axônios dos neurônios neurosecretores parvocelulares do PVN projetam-se para a eminência mediana (conforme ilustrado na figura 1), onde seus terminais nervosos vão liberar o CRH e a VP, entre outros hormônios. Esses neurônios neurosecretores do PVN fazem parte de uma via comum e final do sistema de estresse, que recebe projeções convergentes advindas de múltiplas regiões cerebrais. Estas conexões permitem o CRH coordenar respostas comportamentais, neuroendócrinas, autonômicas e imunes relativas a um evento estressor. Também, essas vias aferentes incluem outras projeções, dentre elas projeções de vias noradrenérgicas ascendentes advindas do tronco cerebral (com informações sensoriais viscerais); vias corticais descendentes e vias límbicas (com informações emocionais e cognitivas); conexões talâmicas (com informações sensoriais); conexões intra-hipotalâmicas (que recebem projeções do tronco cerebral e de estruturas límbicas) e órgãos circunventriculares (desprovidos da proteção da barreira hematoencefálica e, portanto, com sinais quimiossensoriais advindos da corrente sanguínea; SILVERMAN, PEARCE et al., 2005), como a eminência mediana e a neuro-hipófise. Assim, esses neurônios hipotalâmicos que liberam CRH parecem estar estrategicamente situados, interceptando e distribuindo sinais intra e extra-corporais relacionados ao ambiente interno e externo do organismo (MARQUES, SILVERMAN et al., 2009).

Uma vez na eminência mediana, o CRH é liberado na circulação sanguínea porta-hipofisária e age nos receptores CRH-R1 na hipófise anterior (adeno-hipófise) estimulando a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação sanguínea geral. O ACTH circulante age então nos receptores da melanocortina tipo 2 (MC2-R) no córtex adrenal estimulando a liberação de glicocorticoides (como a corticosterona) na corrente sanguínea (SILVERMAN, PEARCE et al., 2005; JACOBSON, 2005).

Com o objetivo de atuar como mecanismos de controles dos níveis de glicocorticoides circulantes, a liberação desses hormônios está submetida à duas alças de retroalimentação negativa principais: uma rápida e outra lenta (figura 1). A alça de retroalimentação negativa rápida (não-genômica) ocorre imediatamente após a liberação de corticosterona, dura 5-10 minutos e age diretamente no hipotálamo

através da regulação da expressão de RNA mensageiro para CRH e VP, resultando na inibição da síntese e liberação de ACTH.

Figura 1.: Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal com as estruturas que compõem esse sistema, hormônios envolvidos e os pontos de controle do eixo (alça de retroalimentação negativa rápida e lenta). Legendas: SNC: sistema nervoso central; PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; CRH: hormônio liberador de corticotrofina; AVP: vasopressina; ACTH: hormônio adrenocorticotrófico. Adaptado de LIGHTMAN & CONWAY-CAMPBELL, 2010.



Já a alça de retroalimentação negativa lenta (genômica) ocorre apenas 1-2 horas após a liberação de corticosterona e pode persistir por até 4 horas. Esta ocorre na adeno-hipófise e atua através da redução da expressão de RNA mensageiro para o precursor de ACTH (HARBUSZ & LIGHTMAN, 1992; DE KLOET, VREUGDENHIL et al., 1998). Há

ainda outra alça de retroalimentação no hipocampo, o qual possui uma alta densidade de receptores GR (um dos receptores para corticosterona; mais detalhes adiante). Esta alça de retroalimentação negativa ocorre no PVN, a qual quando ativada reduz a atividade do eixo HPA (HERMAN, SCHÄFER et al., 1989).

1.4.2 Glicocorticoides

O cortisol/corticosterona, normalmente considerado o hormônio catabólico primário, é o principal membro da família dos hormônios esteroides denominados glicocorticoides. Os efeitos catabólico do cortisol são bem reconhecidos e atribuídos à diminuição da síntese e aumento da degradação proteica (KRAEMER & RATAMESS, 2005), enquanto suas propriedades anti-anabólicas estão relacionadas à diminuição de outros hormônios anabólicos, como a testosterona e o hormônio do crescimento (DESCHENES & KRAEMER, 2002). Análoga do cortisol em roedores, a corticosterona é muito menos potente que o cortisol (4-5% do total da atividade glicocorticoide), mas possui as mesmas funções que o cortisol nos roedores. O cortisol é sintetizado e secretado pelo córtex da glândula adrenal e está sob regulação do eixo HPA. Seu acesso ao cérebro é regulado por uma glicoproteína P que permite que suas ações centrais e periféricas estejam em concerto (MASON, PARIANTE et al., 2008). Assim, conforme já abordado, quando em uma situação de estresse, os níveis plasmáticos de cortisol aumentam rapidamente (PRAGER & JOHNSON, 2009), porém devido à distribuição dos seus receptores em regiões cerebrais específicas, como córtex e hipocampo, suas ações centrais diretas inicialmente se limitam a estas regiões (REUL & DE KLOET, 1985; DE KLOET & REUL, 1987; DE KLOET, 2008).

O efeito dos glicocorticoides na formação e na expressão de memórias aversivas é controverso. Enquanto, por exemplo, há consenso na literatura quanto à facilitação que as catecolaminas exercem sob a formação e a expressão da memória (DE WIED & VERSTEEG, 1974; STERNBERG, ISAACS et al., 1985; BOHUS, 1994; DO-MONTE, CANTERAS et al., 2010; PAVESI, CANTERAS et al., 2011), os glicocorticoides parecem exercer efeitos diferentes nestes dois momentos e, em ambos, o efeito final é dependente do tempo entre a administração da droga e a realização do teste. (FOY, STANTON et al., 1987; DIAMOND, FLESHNER et al., 1996; LUPIEN & MCEWEN, 1997; DE KLOET, OITZL et al., 1999; MCGAUGH & ROOZENDAAL, 2002; MARIN, HUPBACH et al., 2011; FAN, NIU et

al., 2013). Além disso, os efeitos que os glicocorticoides exercem tanto na formação e expressão da memória como na plasticidade sináptica é mediado por dois tipos de receptores esteroides: MR (receptores mineralocorticoides) e GR (receptores glicocorticoides), os quais estão distribuídos em áreas envolvidas com emoção, aprendizado e memória. No cérebro dos roedores, além da aldosterona (mineralocorticoide endógeno), a corticosterona também se liga aos MR, de modo que a afinidade de ligação corticosterona-MR é muito maior que a afinidade de ligação corticosterona-GR (EDWARDS, STEWART et al., 1988; GAEGGELER, EDWARDS et al., 1989). Portanto, em níveis basais ou mesmo no início da reação ao estresse, a corticosterona liga-se, saturando primeiramente, à população de MR.

Os receptores MR estão presentes no hipocampo e em menor quantidade que os receptores GR no córtex pré-frontal, amígdala e no PVN (DIORIO, VIAU et al., 1993). Os receptores GR, por sua vez, estão amplamente distribuídos em praticamente todas as células centrais, porém com abundância particularmente mais elevada em estruturas cerebrais relacionadas ao estresse, como na glândula hipófise (ou pituitária), no PVN, nos neurônios mono-aminérgicos ascendentes do tronco encefálico, nas regiões do giro dentado, CA1 e CA2 do hipocampo e outras regiões do sistema límbico, como núcleos da amígdala, córtex pré-frontal e septo lateral (DE KLOET, 2010).

A função específica de cada tipo de receptores (MR e GR) vem sendo estudada extensivamente através de manipulações farmacológicas e genéticas. Estudos celulares têm proposto vias de sinalização glicocorticoide-dependente que regulam a excitabilidade de circuitos cerebrais chave (JOËLS, KARST et al., 2007). Com este conhecimento de sinalização celular está sendo possível identificar também padrões genéticos exclusivamente responsivos à ativação seletiva de cada um dos tipos de receptor (DATSON, VAN DER PERK et al., 2001). Também, corroborando estes achados celulares, os glicocorticoides vêm se mostrando capazes de agir em condições específicas e possuir efeitos duradouros mediados por genes. Esta condição de natureza específica diz respeito aos efeitos dos glicocorticoides no cérebro ao não serem capazes de deflagrarem respostas celulares e comportamentais sozinhos, mas atuarem de maneira contexto-dependente (JOËLS & DE KLOET, 1992; JOËLS & BARAM, 2009). Isto se mostra particularmente importante para o delineamento dos estudos atuais e futuros, uma vez que o contexto e o momento da intervenção farmacológica com glicocorticoides nas diferentes fases da formação da memória são variáveis importantes para o efeito final observado.

Estudos animais têm revelado que a ativação ou o bloqueio tanto dos receptores MR como dos receptores GR influencia o comportamento relacionado à ansiedade, à exploração de um ambiente novo e à memória. Estes comportamentos estão relacionados ao sistema límbico e fazem parte do repertório comportamental testado em modelos de memória espacial e condicionamentos aversivos (DE KLOET, OITZL et al., 1999). Em relação aos comportamentos relacionados ao medo incondicionado, Smythe e colaboradores (1997) mostraram a modulação dos receptores MR de ratos no modelo da caixa claro-escuro. Oitzl e colaboradores (1994) demonstraram que a injeção intracerebroventricular de um antagonista seletivo MR influenciou a reatividade comportamental induzida por corticosterona em um modelo de memória espacial. No entanto há outras evidências que sugerem que os comportamentos adaptativos são modulados por uma ação combinada entre MR/GR (ROOZENDAL, BOHUS et al., 1996). Neste estudo, Roozendaal e colaboradores (1996) demonstraram que a inibição da produção de corticosterona e, conseqüentemente, a não ativação dos receptores GR frente à total ativação dos receptores MR foi capaz de diminuir a resposta defensiva de congelamento de ratos. Mais tarde, Calfa e colaboradores (2006) observaram que a aplicação de corticosterona exógena foi responsável por aumentar o comportamento ansiogênico de ratos 24 horas após a sua administração, no modelo do labirinto em cruz-elevado (LCE). Entretanto, através da ação do antagonista GR no septo lateral, eliminou-se o efeito ansiogênico e evidenciaram-se os efeitos da corticosterona também sob a memória, uma vez que o teste no LCE foi realizado 24 horas após a intervenção farmacológica. Com relação aos efeitos sob a memória relacionados especificamente aos receptores GR, alguns trabalhos já demonstraram através de agonistas e antagonistas, tanto em aves como em camundongos mutantes para GR, a existência dessa modulação (OITZL, REICHARDT et al., 2001; SANDI & ROSE, 1994; OITZL & DE KLOET, 1992; ROOZENDAAL, 2003). Calvo e Valosin (2001) demonstraram que o efeito induzido pela corticosterona após o estresse de contenção requer a atividade de ambos os receptores glicocorticoides. Contudo, Oitzl e colaboradores (1997) sugerem que os receptores MR são responsáveis pelos efeitos facilitatórios imediatos da corticosterona na aquisição da memória enquanto que, por exemplo, a modulação de memórias espaciais e aversivas requer a participação dos receptores GR.

A Dex, agonista dos receptores GR, é um potente glicocorticoide sintético amplamente utilizada como base do teste de supressão do eixo HPA por dexametasona (CARROLL, FEINBERT et al., 1981). Com

relação à farmacocinética da Dex, hipotetizou-se inicialmente que a hipófise era o principal alvo de ação da Dex na supressão da liberação do ACTH induzido pelo estresse. Entretanto, ao final do seu estudo, De Kloet concluiu que todo o cérebro possuía a mesma afinidade de ligação que a hipófise. De Kloet hipotetizou também esse glicocorticoide sintético era mais retido nas células hipocâmpais que o próprio glicocorticoide endógeno (corticosterona), porém os resultados experimentais obtidos o levaram a rejeitar sua hipótese inicial (DE KLOET, VAN DER VIES et al., 1974). Embora o cortisol (que naturalmente não ocorre em roedores) tenha mostrado pobre acumulação no encéfalo, a corticosterona mostrou-se capaz de acumular-se e ficar retida no hipocampo e em outras estruturas límbicas. Notou-se através desses achados que os neurônios piramidais e o giro denteado do hipocampo eram os primeiros alvos centrais da corticosterona após um evento estressor. Com isso foi possível perceber que a corticosterona (principal hormônio sinalizador do estresse) possui sítio de ligação exatamente em uma das estruturas cerebrais chave para a regulação de funções tanto cognitivas como emocionais.

Estudos posteriores realizados em 1975 e 1976 evidenciaram que a Dex, por ser um glicocorticoide sintético, pouco conseguia penetrar a barreira hematoencefálica (BHE) e que essa pouca quantidade que atingia o interior do encéfalo possuía um padrão regional de distribuição diferente da corticosterona (DE KLOET, WALLACH et al., 1975; McEWEN, WALLACH et al., 1976). Na época sugeriu-se que a supressão da liberação de ACTH na hipófise e consequente impedimento da liberação da corticosterona pela adrenal devido à ação da Dex eram capazes de gerar um estado de “adrenalectomia química”. Essa explicação foi sugerida pela observação de que doses moderadas de Dex eram impedidas de acessar alvos centrais e, ao mesmo tempo, pareciam as responsáveis por depletar os corticoides endógenos no cérebro (DE KLOET, BURBACH et al., 1977). Entretanto, cerca de 20 anos mais tarde, Hornsby e colaboradores (1996) observaram que a “adrenalectomia química” causada pelo tratamento com Dex na verdade ocorre devido ao aumento da apoptose dos neurônios do giro denteado do hipocampo. Descrições desses achados iniciais mostravam que este processo ocorria apenas após a adrenalectomia. Assim, sob a mesma explicação, sugeriu-se que déficits na função cerebral após baixas doses de Dex poderiam ocorrer devido tanto a pouca como a hiper-exposição aos glicocorticoides (HASSAN, VON ROSENSTIEL et al., 1996). No mesmo ano, resultados experimentais obtidos por Schinkel e colaboradores (1996) revelaram que a pouca penetração da Dex no

encéfalo através BHE devia-se, na verdade, à existência de uma glicoproteína P multi-drogas resistente (*mdr1a*-) localizada nesta barreira, a qual atuava através da extrusão de xenobióticos, incluindo os glicocorticoides sintéticos (SCHINKEL, WAGENAAR et al., 1996). Este achado foi demonstrado através de camundongos adrenalectomizados com silenciamento genético do gene *mdr1a* resultando num aumento de 10 vezes na retenção de Dex em alvos centrais, alcançando níveis semelhantes àqueles observados na hipófise (MEIJER, LANGE et al., 1998). Esses dados, portanto, acabaram por sustentar a ideia de que a hipófise é o alvo de ação da Dex na supressão da liberação do ACTH induzido pelo estresse.

Considerando então que após um evento estressor, como o condicionamento aversivo promovido pelo PTZ, hormônios como a corticosterona podem ser liberados para, entre outros efeitos, modular processos de memória e aprendizado relacionados ao evento traumático, o presente estudo foi delineado para avaliar a participação da dexametasona na modulação da memória olfatória aversiva promovida pelo PTZ e da memória contextual aversiva de 2ª ordem promovida a partir do odor condicionado aversivo.

II. HIPÓTESE

O presente trabalho foi delineado para testar a hipótese de que no condicionamento olfatório aversivo promovido pelo PTZ, a supressão do eixo HPA causada pela dexametasona é capaz de prejudicar as etapas de aquisição e de expressão do condicionamento olfatório (1ª ordem) e contextual (2ª ordem) aversivo.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se a dexametasona, agonista GR, era capaz de prejudicar a aquisição e a expressão do condicionamento olfatório (1ª ordem) e contextual (2ª ordem) aversivo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estender a validação do modelo do condicionamento olfatório e contextual aversivo promovido pelo pentilenotetrazol em ratos Long Evans *hooded*;
- Verificar alterações cardiovasculares, bioquímicas (glicose e corticosterona) e eletroencefalográficas decorrentes da administração do PTZ na dose de 15 mg/Kg;
- Determinar se a supressão do eixo HPA, promovida por dexametasona, é capaz de prejudicar a aquisição ou a expressão do condicionamento olfatório aversivo;
- Determinar se a supressão do eixo HPA, promovida por dexametasona, é capaz de prejudicar a aquisição ou a expressão do condicionamento contextual aversivo 2ª ordem.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Neste projeto foram utilizados 452 ratos machos, normais, resultado do cruzamento entre uma linhagem Long Evans *hooded* e *Wistar*, na idade de 3-4 meses (300-400g). Os ratos foram criados e obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina que, após serem desmamados, foram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia da mesma universidade. Aproximadamente oito dias antes do início dos experimentos, os animais foram alocados no biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental, onde todos os procedimentos experimentais de comportamento foram realizados. Os procedimentos experimentais relativos aos registros eletroencefalográficos foram realizados no Laboratório de Neurofarmacologia e os ensaios cardiovasculares de pressão arterial no Laboratório do Óxido Nítrico.

Os ratos foram mantidos em grupos de 3-4 ratos, em caixas de acrílico branca (50x30x15 cm) com maravalha, em ambiente com temperatura (22-24 °C) e iluminação claro/escuro (ciclo de 12h; 7h/19h) controladas. Todos os animais tiveram livre acesso à água e comida.

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais de Laboratório (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número 23080.008789/2009-46. Todos os cuidados foram realizados de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e com o guia comportamental para o uso de animais de laboratório.

4.2 DROGAS

Neste estudo foram utilizadas as seguintes drogas:

- Pentilenotetrazol (PTZ; 6,7,8,9-Tetrahydro-5H-tetrazolo-[1,5-a]azepine, Sigma, Steinheim, Alemanha), antagonista dos receptores GABAérgicos subtipo GABA_A, administrado intraperitonealmente (i.p.) na dose de 15 mg/kg e dissolvido (10 mg/mL) em solução salina (0,9% NaCl). Esta dose foi baseada em trabalhos prévios deste laboratório (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005);

- Solução salina (NaCl 0,9%), utilizada como solução controle das injeções intraperitoneais;
- Dexametasona (Dex; 8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17R)-9-Fluoro-11,17-dihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl)-10,13,16-trimethyl-6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-3H-cyclopenta[a]phenanthren-3-one, Tocris, Bristol, UK), agonista dos receptores glicocorticóides (GR), administrada subcutaneamente (s.c.) nas doses de 0,3; 1 e 3 mg/kg e dissolvida (10 mg/mL) em solução veículo (1% de Tween da solução salina). Esta dose foi baseada em trabalhos prévios deste laboratório (SOUZA, 2011);
- Solução veículo, utilizada como solução controle das injeções subcutâneas (1% de Tween 80);
- Uretana (Ethyl Carbamate, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), utilizado como anestésico do ensaio cardiovascular, na dose de 1,25g/Kg.

4.3 MODELO DO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO E CONTEXTUAL AVERSIVO

O modelo do Condicionamento Olfatório Aversivo (COA), também chamado de Modelo Olfatório e Contextual Aversivo, utilizado neste trabalho foi realizado através de 5 sessões diferentes em si, intercaladas por 24 horas. A sessão de condicionamento olfatório foi realizada em uma *caixa de condicionamento* (Insight Ltda, Ribeirão Preto, Brasil), medindo 50 x 26 x 35 cm, com paredes de alumínio, com exceção da face frontal e da tampa, que foram confeccionadas em acrílico transparente. O assoalho da caixa composto de grades em aço inoxidável, espaçadas em 1 cm. Um compartimento em forma de gaveta localizado abaixo do piso gradeado da caixa serviu para a instalação da fonte do estímulo olfatório durante a sessão de condicionamento. Um pedaço de papel filtro (5 x 5 cm) embebido com 250 µL de solução 5% de acetato de amila (Aldrich Chemical, St. Louis, EUA) foi utilizado como fonte de odor. A caixa foi limpa com solução de etanol 10% e seca com papel toalha após a retirada de cada animal. O condicionamento olfatório foi realizado num ambiente com som atenuado, temperatura controlada ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e intensidade de luz de 80 lux. No dia do condicionamento, após a retirada do rato do aparato, um exaustor acoplado a parede lateral permaneceu ligado durante alguns

minutos, impedindo assim a acumulação do odor volátil de acetato de amila no ambiente.

Antes do início de todas as sessões experimentais do COA, os ratos foram submetidos a uma sessão denominada ambientação, na qual os animais permaneceram por, no mínimo, 30 min numa sala adjacente àquela utilizada para a realização dos experimentos. Assim, no primeiro dia (Dia 1) os animais foram colocados na caixa de condicionamento para exploração do ambiente, numa sessão denominada familiarização, com duração de 5 min. No dia seguinte (Dia 2), designada sessão de condicionamento, os animais foram reexpostos à caixa, onde foi realizado o condicionamento entre o estímulo olfatório neutro (EN, odor de acetato de amila) e o estímulo incondicionado (EI, efeito ansiogênico promovido pela injeção sistêmica de PTZ; 10 min antes da exposição ao odor). Após essa sessão de condicionamento, o estímulo olfatório passa a ser denominado estímulo condicionado de 1ª ordem (EC1).

Com o intuito de diminuir as influências contextuais adquiridas na caixa de condicionamento, a análise do comportamento defensivo foi realizada sob luminosidade atenuada (4 lux) e em uma caixa diferente daquela utilizada no condicionamento, denominada de *caixa de odor*. Este aparato, inteiramente construído em acrílico preto, possui dois compartimentos, um aberto (40 x 26 x 40 cm) e um fechado (20 x 26 x 40 cm) com cobertura. Para permitir a visualização frontal dos animais no modelo, as paredes frontais de ambos os compartimentos foram construídas em acrílico transparente. Uma pequena abertura (6 x 6 cm) situada na parede divisória permitiu o livre acesso do animal aos dois ambientes. Na parede lateral do compartimento aberto, um suporte de acrílico (8 x 5 cm) vazado foi afixado, contendo ou não o pedaço de papel filtro embebido com a mesma quantidade de acetato de amila utilizado no condicionamento olfatório (250 µL). No piso da caixa, uma marcação localizada a 7 cm da parede lateral serviu como referência para delimitar a área próxima ao suporte.

Todos os animais foram colocados na caixa de odor pelo compartimento aberto junto à parede divisória, com a cabeça direcionada para o suporte onde foi, posteriormente, colocado o odor. No primeiro dia de exposição à caixa de odor (familiarização – Dia 3) os sujeitos exploraram e habituaram-se ao ambiente, de modo que o nível basal da resposta defensiva foi obtido na ausência do EC1. No dia seguinte (Dia 4) os parâmetros comportamentais da expressão do condicionamento aversivo foram medidos nos ratos confrontados com o odor condicionado (teste EC1). Nesta sessão também ocorre a aquisição do condicionamento contextual aversivo (CCA) de 2ª ordem, uma vez

que o odor de acetato de amila (EC1) age como EI e promove a associação aversiva entre o odor e o contexto. Vinte e quatro horas após, os ratos foram novamente colocados na caixa de odor, sem a presença do odor de acetato de amila (Dia 5), para determinar a ocorrência do condicionamento contextual de 2ª ordem (teste EC2). Durante as sessões de familiarização e teste EC2 (Dias 3 e 5) o suporte acrílico contendo um pedaço de papel filtro limpo (odor neutro) foi utilizado somente como pista visual. No teste EC1, quando o odor de acetato de amila esteve presente na caixa de odor, o exaustor foi ligado entre a colocação de um sujeito experimental e outro para evitar o acúmulo de odor na sala.

Para garantir a coleção dos dados, uma câmera conectada a um sistema de televisão/DVD permitiu a filmagem e gravação dos animais na diferentes sessões. A análise do comportamento defensivo foi realizada pelo experimentador durante os 3 dias de exposição à caixa de odor ao longo de cada sessão de 10 min de exposição. Todos os experimentos realizados (experimento 1 ao 12) pelo presente trabalho foram realizados de maneira independente, iniciando sempre com animais *naïve*. Os parâmetros analisados foram baseados em experimento de exposição ao odor de gato (DIELENBERG & MCGREGOR, 2001; DO MONTE, CANTERAS et al., 2008), caracterizado pelos seguintes padrões comportamentais:

- *Tempo de aproximação*: tempo em que os animais permaneceram com pelo menos a cabeça ou uma das patas próxima a fonte de odor, na distância delimitada de 7 cm do suporte;
- *Tempo escondido*: tempo em que os animais permaneceram com as 4 patas no compartimento fechado da caixa de odor;
- *Tempo de Head-out*: tempo em que os ratos permaneceram no compartimento fechado da caixa e com a cabeça e/ou as patas dianteiras invadindo o compartimento aberto, realizando um comportamento denominado avaliação de risco.

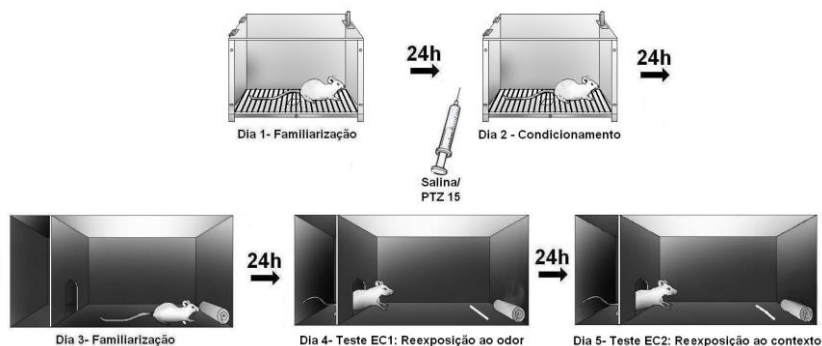
4.4 PROCEDIMENTOS

4.4.1 ETAPA I: Validação estendida do modelo do condicionamento olfatório e contextual aversivo promovido pelo pentilenotetrazol em ratos Long Evans *hooded*

4.4.1.1 Experimento 1: Avaliação comportamental do modelo de condicionamento olfatório aversivo utilizando o pentilenotetrazol como estímulo incondicionado

Com o intuito de estender a validação do PTZ como EI interoceptivo em ratos Long Evans *hooded*, os animais foram submetidos ao modelo do COA, descrito no item 4.3. Para isso, 10 ou 30 min antes da exposição dos ratos ao odor, o PTZ foi injetado sistemicamente. Após este tempo, os ratos foram então colocados em contato com o odor na sessão de condicionamento que teve duração de 2,5 min. Foi conduzido ainda, o grupo “não-pareado”, o qual diz respeito a injeção do PTZ e a exposição ao odor (condicionamento olfatório) serem realizados de maneira não associada (injeção de PTZ no Dia 1; exposição ao odor no Dia 2). Após a sessão do Dia 2, os animais foram alocados em suas caixas moradias em ambiente separado dos demais animais que ainda não haviam passado pelo modelo. Nos Dias 3, 4 e 5 os parâmetros comportamentais de tempo de aproximação (%), tempo escondido (%) e tempo de *Head-out* (%) foram coletados nas sessões de familiarização, teste EC1 e teste EC2, respectivamente. Este protocolo encontra-se ilustrado na figura 2.

Figura 2.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a avaliação do condicionamento aversivo de 1ª e 2ª ordem. Administrou-se salina ou PTZ (15mg/kg, i.p., 10 min antes) como EI em associação ao odor de acetato de amila (5%, 250µL) como estímulo olfatório e avaliaram-se as respostas defensivas na caixa de odor. Legenda: PTZ: pentilenotetrazol; EI: estímulo incondicionado; EC1: estímulo condicionado 1; EC2: estímulo condicionado 2.



Fonte: desenho confeccionado por Fábio Amorim Vieira.

4.4.1.2 Experimento 2: Avaliação do registro eletroencefalográfico após a administração sistêmica de pentilenotetrazol

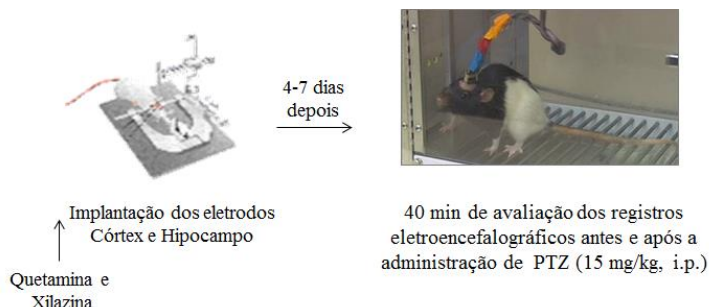
4.4.1.2.1 Registros eletroencefalográficos (EEG)

Considerando que o PTZ em altas doses pode apresentar efeitos epileptogênicos e, que em doses menores apresenta traçado sub-convulsivante no EEG que normalmente pode ser associados ao perfil ansiogênico desta droga, o objetivo deste experimento foi verificar o perfil eletroencefalográfico do PTZ na dose de 15 mg/Kg; i.p. Para isso, foi realizada uma cirurgia estereotáxica para implantação dos eletrodos direcionados para as regiões de córtex (Cx) e hipocampo (Hp) dos animais. Para realização do implante dos eletrodos de EEG, os animais foram anestesiados com xilazina (20 mg/Kg, i.p.) e quetamina (10 mg/Kg, i.p.) e, após a confirmação da ausência de reflexos de retirada da pata frente ao pinçamento das pregas interdigitais e da retração da cauda após pinçamento da mesma, os animais foram cuidadosamente posicionados em um aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, USA). Em seguida, realizou-se a tricotomia, a assepsia local com álcool iodado e a injeção local de lidocaína (com 2% de vasoconstritor por via

subcutânea) formando uma pápula na parte posterior da cabeça do animal. Uma incisão sagital foi realizada para a exposição da calota craniana e remoção do periósteo. Após a raspagem do periósteo a calota craniana foi exposta e perfurada com uma broca odontológica para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável e eletrodos na região do córtex e hipocampo (córtex: AP: 2,5; ML: -0,6; DV: -4,8 mm/hipocampo: AP: -4,8; ML: -5,0; DV: -6,5 mm). As coordenadas utilizadas basearam-se sempre em relação ao Bregma e estão de acordo com as coordenadas de Paxinos e Watson (1986) para estas estruturas. Após a cirurgia cada animal foi colocado numa caixa moradia, acoplada a uma lâmpada de 40 W para aquecimento e melhor recuperação pós-cirúrgica dos mesmos.

Evidências na literatura indicam efeito convulsivante do PTZ em altas doses (RODIN, 1958; RODIN & CALHOUN, 1970). Para verificar se a dose adotada por este estudo era capaz de provocar alterações significativas no EEG na presente condição experimental, 7 dias após a realização da cirurgia para a implantação dos eletrodos intracerebrais, os animais foram habituados individualmente a uma caixa de vidro (30 x 50 x 40 cm), na qual eles permaneceram enquanto os sinais bioelétricos foram sendo adquiridos. Estes sinais bioelétricos são obtidos através de um sistema digital poligráfico (BIOPAC System, MP-100/WSW, Inc). Durante a ambientação, o microconector implantado no animal foi acoplado a um cabo de aquisição que transmite os sinais da atividade elétrica encefálica para o sistema de amplificação. Os sinais elétricos foram amplificados 20.000 vezes, filtrados em 0.5-30 Hz, em uma taxa amostral de 256 Hz e registrados através do *software* ACQKnowledge versão 3.2. Após o período de habituação de 5 min, foi iniciado o registro eletrográfico basal de 10 min seguido pelo tratamento com PTZ (15 mg/Kg/mL i.p.). Após a injeção, o EEG foi registrado continuamente por 40 min, conforme ilustrado na figura 3. A análise do EEG foi realizada pela inspeção visual direta, buscando-se detectar achados eletrográficos característicos de atividade epileptiforme, seguida por uma análise quantitativa mais apurada (análise espectral *wavelet* de Morlet). A análise espectral *wavelet* de Morlet é um método desenvolvido para análise de sinais com componentes dinâmicos e uma variedade de frequências, que permite o estudo de domínios de tempo e frequência (ROSSETTI, RODRIGUES et al., 2006; ROMCY-PEREIRA, DE ARAUJO et al., 2008).

Figura 3.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a avaliação dos registros eletroencefalográficos antes e após a administração sistêmica de PTZ (15 mg/Kg). Inicialmente os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina para serem submetidos à cirurgia estereotáxica (implantação dos eletrodos em córtex e hipocampo). Aguardou-se, após a cirurgia, de 4-7 dias para a recuperação cirúrgica dos animais. No dia da avaliação eletroencefalográfica, os animais foram cuidadosamente colocados no aparato e, então, acoplados ao cabo que adquiriu os sinais elétricos. Após a estabilização do aparato, os registros basais foram coletados por 10 min e, após este tempo, o PTZ (15 mg/kg; i.p.) foi injetado. Após a injeção da droga, os registros foram coletados por mais 30 min. Legenda: PTZ: pentilenotetrazol.



4.4.1.3 Experimento 3: Avaliação dos parâmetros cardiovasculares após a administração sistêmica de pentilenotetrazol (PTZ)

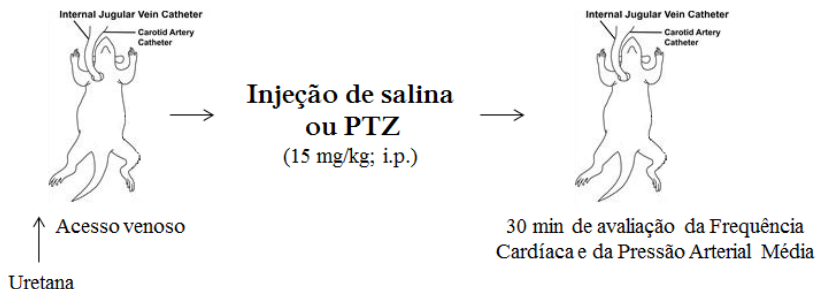
4.4.1.3.1 Monitoramento Cardíaco

O objetivo deste experimento foi verificar se o PTZ na dose de 15 mg/Kg; i.p. era capaz de causar alterações autonômicas sob a frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM). Para isto, os animais foram inicialmente anestesiados com uretana (1,25g/Kg; i.p.) e, em seguida, realizou-se uma pequena incisura abaixo do pescoço, no lado ventral do animal. A artéria carótica esquerda foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Com o auxílio de uma linha de sutura, o fluxo sanguíneo deste vaso foi interrompido na altura da extremidade distal, enquanto o fluxo proximal

foi temporariamente suprimido através da compressão do mesmo com o auxílio de uma pinça curva. Um cateter de polietileno (angiocath®, número 19), heparinizado, foi inserido à artéria e conectado a um transdutor de pressão interligado a um equipamento de análise de pressão arterial PowerLab 8/30 (AD instruments® Pty Ltd, Castle Hill, Australia). Os valores referentes à FC (número de batimentos por minuto - BPM) e a PAM (milímetros de mercúrio-mmHg) foram registrados a cada 0,5 segundo através de um computador (sistema operacional Windows XP®, Microsoft Corporation, EUA) por um software de integração (Chart 5®) do fabricante.

Após a manipulação cirúrgica e um período de estabilização de 15 min, os efeitos sobre a FC e a PAM foram registrados antes e após a administração da droga em questão (PTZ 15 mg/kg; i.p.; n=4) e do controle (salina; i.p; n=3; figura 4). Os animais foram monitorados por 30 min, permanecendo anestesiado por todo esse período.

Figura 4.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a avaliação dos parâmetros cardiovasculares (pressão artéria média e frequência cardíaca) antes e após a administração sistêmica de PTZ (15 mg/Kg). Inicialmente os animais foram anestesiados com uretana (1,25g/Kg; i.p.) para se proceder com o acesso venoso. Após a estabilização do aparato, salina ou PTZ (15 mg/Kg, i.p.) foi injetado nos ratos. Monitorou-se o efeito do tratamento por 30 min. Legenda: PTZ: pentilenotetrazol.



4.4.1.4 Experimento 4: Avaliação da glicemia após a administração sistêmica de pentilenotetrazol

Com o intuito de verificar se o PTZ era capaz de causar alterações nas taxas da glicose sanguínea, os ratos foram submetidos aos 2 primeiros dias do protocolo experimental do modelo de COA. Conforme ilustrado pela figura 5, os sujeitos foram familiarizados à caixa de condicionamento no Dia 1 por 5 min na ausência de odor. Vinte e quatro horas após, os ratos foram então submetidos ao COA com PTZ. Imediatamente após a sessão de condicionamento (12,5 min após a injeção de PTZ), amostras de sangue (0,6 μ L) foram coletadas e a taxa de glicemia foi mensurada (Accu Check® Performa, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) em amostras de sangue coletadas da extremidade final da cauda. Para o procedimento de coleta, os animais foram transportados individualmente para uma sala diferente da experimental onde, após serem cuidadosamente posicionados, as amostras foram coletadas através de uma pequena incisão realizada com o auxílio de um bisturi na extremidade final da cauda, de acordo com FLUTTERT, DALM et al., 2000. Este procedimento (posicionamento dos animais e coleta) durou até, no máximo, 5 min.

Figura 5.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a dosagem da glicemia após a administração sistêmica de salina ou PTZ (15 mg/Kg). No dia 1, os ratos foram familiarizados à caixa de condicionamento na ausência de odor por 5 min. Vinte horas depois, a sessão de condicionamento olfatório ocorreu na caixa de condicionamento. Dez min antes desta sessão, os animais foram injetados com salina ou PTZ (15 mg/Kg; i.p.). A sessão de condicionamento teve duração de 2,5 min na presença do odor de acetato de amila (250 μ L, 5%). Imediatamente após o fim da sessão de condicionamento, o sangue foi coletado e a glicose sanguínea quantificada. Legenda: PTZ: pentilenotetrazol.



4.4.1.5 Experimento 5: Avaliação da corticosterona plasmática após a administração de pentilenotetrazol

Da mesma forma que para dosagem de glicemia, os sujeitos submetidos à coleta de sangue para dosagem de corticosterona foram expostos ao Dias 1 e 2 do protocolo de COA (descrito no item 4.4.1.4). Este experimento foi realizado objetivando verificar se o PTZ na dose de 15 mg/Kg; i.p. era capaz de causar elevações nos níveis de corticosterona periférico, uma vez que o efeito do PTZ possui características aversivas (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005). Dessa forma, os animais foram divididos em 4 grupos: a) *naïve*, os quais não foram submetidos a nenhuma sessão do COA, exceto a ambientação; b) salina, condicionados ao odor de acetato de amila com injeção i.p de salina; c) PTZ, condicionados ao odor de acetato de amila com injeção i.p de PTZ; e d) contenção, expostos por 20 min ao modelo de estresse de contenção, modelo clássico utilizado para indução do aumento de corticosterona (JAGGI, BHATIA et al., 2011). O estresse de contenção ocorreu em aparato específico (Insight®, Ribeirão Preto, Brasil) e, imediatamente após o término dos 20 min, as amostras de sangue foram coletadas. No caso dos animais injetados com salina ou PTZ (expostos as duas sessões iniciais do COA; figura 6) , todas as amostras de sangue foram coletadas 30 min após o término do condicionamento olfatório. Entre o fim da sessão de condicionamento olfatório e a coleta (30 min), os animais foram alocados em sala adjacente, em caixa moradia com maravalha limpa. Para o procedimento de coleta, a mesma ocorreu para dosagem de glicose (item anterior 4.4.1.4.). Assim, as amostras foram coletadas usando micropipeta (Hamilton Softgrip Pipette 100 µL-1000 µL, USA) e imediatamente armazenadas em eppendorf até que sua coagulação completa. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação (3000 RMP/10 min) para separação e coleta do soro e armazenadas em freezer (-30°C) até a realização do ensaio imunoenzimático (dosagem). No dia da dosagem, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas com auxílio da agitação em vórtice. Diluiu-se as amostras em 1:50 e as concentrações de corticosterona foram avaliadas em duplicata para ensaio imunoenzimático (ELISA - Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay; Corticosterone ELISA, IBL International®, Germany – Referência: 52211 e 25211). Para o ensaio, utilizou-se 20 µL das soluções padrão e das amostras. A construção das curvas padrão foi feita através de concentrações padrão de 0,5, 15, 30, 60, 120 e 240 nmol/L providas pelo kit do conjunto ELISA. A

densidade óptica (450 nm) para cada poço das placas do conjunto foi medida utilizando um leitor de placa (TECAN Group Ltd., Switzerland) dentro de 10 min após a adição de solução de parada para o encerramento da reação enzimática. A determinação das curvas de concentração foi feita por método automatizado (4 parameter logistics curve fit). O cálculo dos resultados foi feito após a construção de curvas padrão e plotagem das absorbâncias médias dentro das curvas padrão. Todas as amostras ficaram dentro do limite das curvas padrão.

Figura 6.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a avaliação da corticosterona plasmática após a administração sistêmica de salina ou PTZ (15 mg/Kg). No dia 1, os ratos foram familiarizados à caixa de condicionamento na ausência de odor por 5 min. Vinte horas depois, a sessão de condicionamento olfatório ocorreu na caixa de condicionamento. Dez min antes desta sessão, os animais foram injetados com salina ou PTZ (15 mg/Kg; i.p.). A sessão de condicionamento teve duração de 2,5 min na presença do odor de acetato de amila (250 μ L, 5%). Trinta min após o fim da sessão de condicionamento, o sangue dos animais foi coletado e a corticosterona plasmática quantificada. Legenda: PTZ: pentilenotetrazol.



4.4.2 ETAPA II: Efeito da administração do agonista GR, dexametasona, na aquisição do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol

4.4.2.1 Experimento 6: Avaliação do efeito da dexametasona sob a aquisição do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol

Para verificar o efeito da dexametasona (Dex) sob a etapa de formação (aquisição) do COA, os animais foram expostos ao protocolo descrito no item 4.3.1. Assim, após a familiarização no primeiro dia, no Dia 2 os animais foram condicionados ao odor de acetato de amila com PTZ. Sessenta min antes do COA os animais foram injetados subcutaneamente com veículo ou Dex (0,3; 1 e 3 mg/Kg, s.c.). Nos dias subsequentes, os animais foram introduzidos à caixa de odor nas sessões de familiarização, teste EC1 e teste EC2, onde os dados comportamentais foram coletados, conforme ilustrado abaixo pela figura 7.

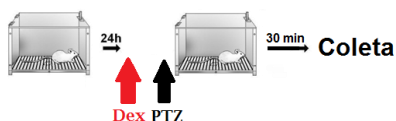
Figura 7.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a avaliação do efeito do veículo ou Dex (0,3, 1 ou 3 mg/Kg; s.c.) sob a aquisição do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo PTZ (15 mg/Kg; i.p.). No dia 1, os ratos foram familiarizados à caixa de condicionamento na ausência de odor por 5 min. Vinte e quatro horas depois, a sessão de condicionamento olfatório ocorreu. Dez min antes desta sessão, os animais foram injetados com salina ou PTZ e, 60 min antes desta sessão, os animais foram injetados com veículo ou Dex. A sessão de condicionamento teve duração de 2,5 min na presença do odor de acetato de amila (250 μ L, 5%). No dia 3, os animais foram familiarizados à caixa de odor na ausência do odor condicionado. No dia seguinte, ocorreu o teste EC1 na presença do odor de acetato de amila (250 μ L, 5%). No dia 5, ocorreu a reexposição ao contexto (teste EC2) na ausência do odor. Todas as sessões na caixa de odor tiveram duração de 10 min. Legenda: Dex: dexametasona; PTZ: pentilenotetrazol.



4.4.2.2 Experimento 7: Avaliação da corticosterona plasmática após a injeção de dexametasona na aquisição do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol

Com o objetivo de quantificar os níveis de corticosterona após a aquisição do COA sob efeito da Dex, amostras de sangue foram coletadas após a sessão de condicionamento (Dia 2) através de uma pequena incisão realizada com o auxílio de um bisturi na extremidade final da cauda, conforme detalhado no item 4.4.1.4 e ilustrado na figura 8. As injeções subcutâneas (veículo ou Dex) foram injetadas 60 min antes da sessão de condicionamento ao odor e as injeções intraperitoneais (salina ou PTZ) foram realizadas 10 min antes da sessão de condicionamento ao odor. Assim, os animais foram divididos nos seguintes grupos: a) *naïve*; b) veículo+salina; c) veículo+PTZ (15 mg/Kg; i.p.); d) Dex 0,3 (0,3 mg/Kg; s.c.)+PTZ; e) Dex 1(1 mg/Kg; s.c.)+PTZ; e f) Dex 3 (3 mg/Kg; s.c.)+PTZ.

Figura 8.: Desenho do procedimento experimental utilizado para dosagem de corticosterona plasmática na aquisição do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo PTZ (15 mg.Kg) após a administração de veículo ou Dex (0,3, 1 ou 3 mg/Kg; s.c.). No dia 1, os ratos foram familiarizados à caixa de condicionamento na ausência de odor por 5 min. Vinte e quatro horas depois, a sessão de condicionamento olfatório ocorreu. Dez min antes desta sessão, os animais foram injetados com salina ou PTZ e, 60 min antes desta sessão, os animais foram injetados com veículo ou Dex. A sessão de condicionamento teve duração de 2,5 min na presença do odor de acetato de amila (250µL, 5%). Trinta min após o término da sessão de condicionamento olfatório (dia 2), o sangue dos animais foi coletado para quantificação de corticosterona plasmática através do método de ELISA. Legenda: Dex: dexametasona; PTZ: pentilenotetrazol.

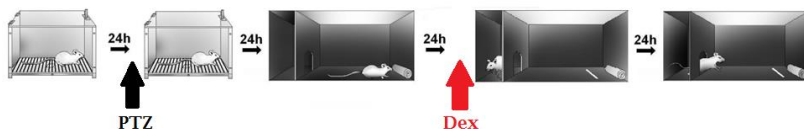


4.4.3 ETAPA III: Efeito da administração do agonista GR, dexametasona, na expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol e na aquisição do condicionamento contextual de 2ª ordem

4.4.3.1 Experimento 8: Avaliação comportamental da dexametasona na expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol e na aquisição do condicionamento contextual aversivo de 2ª ordem

Para verificar o efeito da Dex na expressão do COA e na aquisição do condicionamento contextual de 2ª ordem, os sujeitos foram expostos ao protocolo descrito no item 4.3.1 e ilustrado na figura 9. Assim, no Dia 4, sessenta min antes do teste EC1, os animais foram injetados subcutaneamente com veículo ou Dex (0,3; 1 e 3 mg/Kg), os animais foram reexpostos ao EC. No Dia 5, os animais foram reexpostos ao contexto.

Figura 9.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a avaliação do efeito do veículo ou Dex (0,3, 1 ou 3 mg/Kg; s.c.) sob a expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo PTZ (15 mg/Kg; i.p.) e sob a aquisição do condicionamento contextual aversivo (2ª ordem) promovido pelo odor condicionado. No dia 1, os ratos foram familiarizados à caixa de condicionamento na ausência de odor por 5 min. Vinte e quatro horas depois, a sessão de condicionamento olfatório ocorreu. Dez min antes desta sessão, os animais foram injetados com salina ou PTZ. A sessão de condicionamento teve duração de 2,5 min na presença do odor de acetato de amila (250µL, 5%). No dia 3, os animais foram familiarizados à caixa de odor na ausência do odor condicionado. No dia seguinte, ocorreu o teste EC1 na presença do odor de acetato de amila (250µL, 5%). Sessenta min antes da sessão de teste EC1, os animais foram injetados com veículo ou Dex. No dia 5, ocorreu a reexposição ao contexto (teste EC2) na ausência do odor. Todas as sessões na caixa de odor tiveram duração de 10 min. Legenda: Dex: dexametasona; PTZ: pentilenotetrazol.



4.4.3.2 Experimento 9: Avaliação da corticosterona plasmática após a injeção de dexametasona na expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol e na aquisição do condicionamento contextual aversivo de 2ª ordem

Com o objetivo de quantificar os níveis de corticosterona no momento da expressão do COA e aquisição do CCA de 2ª ordem, ambos sob efeito da Dex, amostras de sangue foram coletadas após o teste EC1(Dia 4) através de uma pequena incisão realizada com o auxílio de um bisturi na extremidade final da cauda, conforme detalhado no item 4.4.1.4 e ilustrado pela figura 10. As injeções subcutâneas (veículo ou Dex) foram injetadas 60 min antes da sessão de teste EC1 e as injeções intraperitoneais (salina ou PTZ) foram realizadas 10 min antes da sessão de condicionamento ao odor. Assim, os animais foram divididos nos grupos: a) *naïve*; b) salina+veículo; c) PTZ (15 mg/Kg; i.p)+veículo; d) PTZ+Dex 0,3 (0,3 mg/Kg; s.c.); e) PTZ+Dex 1 (1 mg/Kg; s.c.); e f) PTZ+ Dex 3 (3 mg/Kg; s.c.).

Figura 10.: Desenho do procedimento experimental utilizado para dosagem de corticosterona plasmática na expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo PTZ (15 mg/Kg) após a administração de veículo ou Dex (0,3, 1 ou 3 mg/Kg; s.c.). No dia 1, os ratos foram familiarizados à caixa de condicionamento na ausência de odor por 5 min. Vinte e quatro horas depois, a sessão de condicionamento olfatório ocorreu. Dez min antes desta sessão, os animais foram injetados com salina ou PTZ. A sessão de condicionamento teve duração de 2,5 min na presença do odor de acetato de amila (250µL, 5%). No dia 3, os animais foram familiarizados à caixa de odor na ausência do odor condicionado. No dia seguinte, ocorreu o teste EC1 na presença do odor de acetato de amila (250µL, 5%). Sessenta min antes da sessão de teste EC1, os animais foram injetados com veículo ou Dex. Trinta min após o término da sessão de teste EC1, o sangue dos animais foi coletado para quantificação de corticosterona plasmática através do método de ELISA. Todas as sessões na caixa de odor tiveram duração de 10 min. Legenda: Dex: dexametasona; PTZ: pentilenotetrazol.

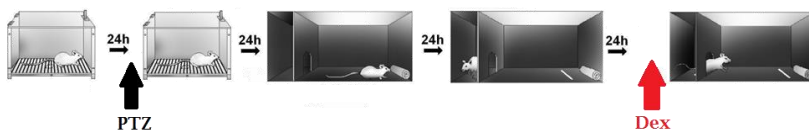


4.4.4 ETAPA IV: Efeito da administração do agonista GR, dexametasona, na expressão do condicionamento contextual aversivo de 2ª ordem

4.4.4.1 Experimento 10: Avaliação comportamental da dexametasona na expressão do condicionamento contextual aversivo (CCA) de 2ª ordem

Com o objetivo de observar o efeito da Dex na expressão do CCA sob efeito da Dex, os ratos foram expostos ao protocolo descrito no item 4.3.1 e ilustrado na figura 11. Assim, após a familiarização (Dia 1), o condicionamento olfatório (Dia 2), familiarização (Dia 3), teste EC1 (Dia 4), os animais foram reexpostos ao contexto condicionado no Dia 5. Sessenta min antes do teste EC2, os animais foram injetados subcutaneamente com veículo ou Dex (0,3; 1 e 3 mg/Kg) e os dados foram então coletados.

Figura 11.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a avaliação do efeito do veículo ou Dex (0,3, 1 ou 3 mg/Kg; s.c.) sob a expressão do condicionamento contextual aversivo (2ª ordem) promovido pelo odor condicionado. No dia 1, os ratos foram familiarizados à caixa de condicionamento na ausência de odor por 5 min. Vinte e quatro horas depois, a sessão de condicionamento olfatório ocorreu. Dez min antes desta sessão, os animais foram injetados com salina ou PTZ (15 mg/Kg; i.p.). A sessão de condicionamento teve duração de 2,5 min na presença do odor de acetato de amila (250µL, 5%). No dia 3, os animais foram familiarizados à caixa de odor na ausência do odor condicionado. No dia seguinte, ocorreu o teste EC1 na presença do odor de acetato de amila (250µL, 5%). No dia 5, ocorreu a reexposição ao contexto (teste EC2) na ausência do odor. Sessenta min antes da sessão de teste EC2, os animais foram injetados com veículo ou Dex. Todas as sessões na caixa de odor tiveram duração de 10 min. Legenda: Dex: dexametasona; PTZ: pentilenotetrazol.



4.4.4.2 Experimento 11: Avaliação da corticosterona plasmática após a injeção de dexametasona na expressão do condicionamento contextual aversivo de 2ª ordem

Com o objetivo de quantificar os níveis de corticosterona no momento da expressão do CCA sob efeito da Dex, amostras de sangue foram coletadas após o teste EC2 (Dia 5) através de uma pequena incisão realizada com o auxílio de um bisturi na extremidade final da cauda, conforme detalhado no item 4.4.1.4 e ilustrado na figura 12. As injeções subcutâneas (veículo ou Dex) foram injetadas 60 min antes da sessão de teste EC2 e as injeções intraperitoneais (salina ou PTZ) foram realizadas 10 min antes da sessão de condicionamento ao odor. Assim, os animais foram divididos nos grupos: a) *naïve*; b) salina+veículo; c) PTZ (15 mg/Kg; i.p.)+veículo; d) PTZ+Dex 0,3 (0,3 mg/Kg; s.c.); e) PTZ+Dex 1 (1 mg/Kg; s.c.); e f) PTZ+ Dex 3 (3 mg/Kg; s.c.).

Figura 12.: Desenho do procedimento experimental utilizado para dosagem de corticosterona plasmática na expressão do condicionamento contextual aversivo promovido pelo odor condicionado (2ª ordem) após a administração de veículo ou Dex (0,3, 1 ou 3 mg/Kg; s.c.). No dia 1, os ratos foram familiarizados à caixa de condicionamento na ausência de odor por 5 min. Vinte e quatro horas depois, a sessão de condicionamento olfatório ocorreu. Dez min antes desta sessão, os animais foram injetados com salina ou PTZ (15 mg/Kg; i.p.). A sessão de condicionamento teve duração de 2,5 min na presença do odor de acetato de amila (250µL, 5%). No dia 3, os animais foram familiarizados à caixa de odor na ausência do odor condicionado. No dia seguinte, ocorreu o teste EC1 na presença do odor de acetato de amila (250µL, 5%). No dia 5, ocorreu a reexposição ao contexto (teste EC2) na ausência do odor. Sessenta min antes da sessão de teste EC2, os animais foram injetados com veículo ou Dex. Trinta min após o término da sessão de teste EC2, o sangue dos animais foi coletado para quantificação de corticosterona plasmática através do método de ELISA. Todas as sessões na caixa de odor tiveram duração de 10 min. Legenda: Dex: dexametasona; PTZ: pentilenotetrazol.



4.4.5 ETAPA V: Efeito da administração do agonista GR, dexametasona, na expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol e na expressão do condicionamento contextual de 2ª ordem

4.4.5.1 Experimento 12: Efeito comportamental da dupla administração de dexametasona na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na expressão do condicionamento contextual de 2ª ordem

Para verificar se o efeito observado na etapa III estava relacionado à dependência de estado em relação ao efeito da Dex, se administrou, no mesmo sujeito experimental, duas injeções subcutâneas de veículo ou Dex (3 mg/kg). Estas injeções foram injetadas 60 min antes da sessão de teste EC1 e da sessão de teste EC2, conforme ilustrado na figura 13. A injeção intraperitoneal de PTZ manteve-se 10 min antes da sessão de condicionamento ao odor. Assim, os animais foram divididos nos grupos: a) PTZ+veículo+veículo; b) PTZ+veículo+Dex 3; c) PTZ+Dex 3+veículo; e d) PTZ+Dex 3+Dex 3.

Figura 13.: Desenho do procedimento experimental utilizado para a avaliação do efeito do veículo ou Dex (3 mg/Kg; s.c.) sob a expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo PTZ (15 mg/Kg; i.p.) e sob a expressão do condicionamento contextual aversivo (2ª ordem) promovido pelo odor condicionado. No dia 1, os ratos foram familiarizados à caixa de condicionamento na ausência de odor por 5 min. Vinte e quatro horas depois, a sessão de condicionamento olfatório ocorreu. Dez min antes desta sessão, os animais foram injetados com salina ou PTZ. A sessão de condicionamento teve duração de 2,5 min na presença do odor de acetato de amila (250µL, 5%). No dia 3, os animais foram familiarizados à caixa de odor na ausência do odor condicionado. No dia seguinte, ocorreu o teste EC1 na presença do odor de acetato de amila (250µL, 5%). Sessenta minutos antes da sessão de teste EC1, os animais foram injetados com veículo ou Dex. No dia 5, ocorreu a reexposição ao contexto (teste EC2) na ausência do odor. Sessenta min antes da sessão de teste EC2, os animais foram injetados com veículo ou Dex. No dia 6, ocorreu uma nova reexposição ao odor previamente condicionado. Todas as sessões na caixa de odor tiveram duração de 10 min. Legenda: Dex: dexametasona; PTZ: pentilenotetrazol.



4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) de uma (tratamento) ou duas (tratamento *versus* tempo) vias seguida do teste de *post hoc* de Newman-Keuls foi utilizada para detectar as diferenças nos parâmetros de tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de *head-out* durante a fase de testes do modelo de condicionamento olfatório aversivo.

Os dados foram representados por média \pm erro padrão da média (e.p.m.) através do programa Prisma 5.0 (GraphPad Prism®, San Diego, EUA). O nível de significância estatística adotado em todos os experimentos foi de $p < 0,05$ e de tendência estatística de $0,1 > p > 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa STATISTICA (versão 8.0, Statsoft®, Tulsa, USA).

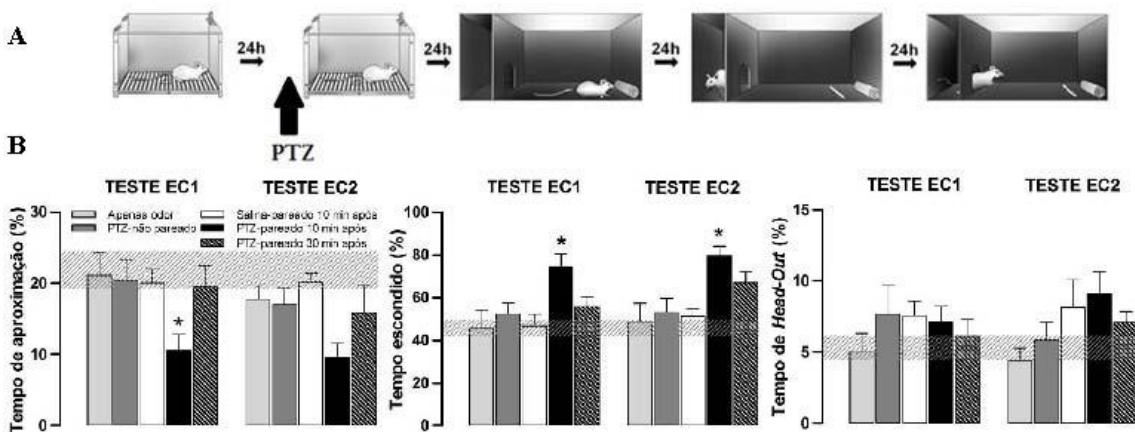
V. RESULTADOS

5.1 ETAPA I: VALIDAÇÃO ESTENDIDA DO MODELO DO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO E CONTEXTUAL AVERSIVO PROMOVIDO PELO PENTILENOTETRAZOL EM RATOS LONG EVANS *HOODED*

5.1.1 Experimento 1: Avaliação comportamental do modelo de condicionamento olfatório aversivo utilizando o pentilenotetrazol como estímulo incondicionado

O conjunto de dados obtidos nesta etapa experimental pode ser observado na figura 14. Os grupos experimentais foram: salina-pareado 10 min após (n=10), apenas odor (n=5), PTZ-não pareado (n=6), PTZ-pareado 10 min após (n=12) e PTZ-pareado 30 min após (a injeção sistêmica de PTZ; n=11). A ANOVA revelou para a porcentagem do tempo de aproximação efeito significativo para o fator tratamento no teste EC1 [$F(4,39)=3,19$, $p=0,0233$] e tendência a significância no teste EC2 [$F(4,39)=2,46$, $p=0,06167$], mas não para a familiarização [$F(4,39)=1,11$, $p=0,36681$]. Para a porcentagem de tempo escondido, a ANOVA detectou efeito significativo para o fator tratamento no teste EC1 [$F(4,39)=4,42$, $p=0,00485$] e no teste EC2 [$F(4,39)=6,68$, $p=0,00034$], mas não para a familiarização [$F(4,39)=0,97$, $p=0,43350$]. Para a porcentagem de tempo de *Head-out*, a ANOVA não detectou nenhuma diferença estatística significativa. O teste *post-hoc* revelou que apenas o grupo PTZ-pareado diminuiu significativamente a porcentagem de tempo de aproximação em relação a todos os demais grupos, bem como aumentou significativamente a porcentagem de tempo escondido em comparação com todos os demais grupos. Esses dados sugerem que o efeito do PTZ, quando promovido em associação com um odor neutro, pode atuar como EI e promover o condicionamento olfatório e contextual aversivo.

Figura 14.: Avaliação da resposta defensiva nas sessões de teste EC1 e teste EC2 através dos parâmetros de (B) porcentagem de tempo de aproximação, porcentagem de tempo escondido e porcentagem de tempo de *Head-out* dos animais injetados intraperitonealmente com salina ou PTZ (15mg/kg) 10 ou 30 min antes da sessão de condicionamento ao odor de acetato de amila (EC1; 5%, 250 μ L). Os animais do grupo “apenas odor” não receberam qualquer injeção e foram expostos ao odor na sessão de condicionamento olfatório (dia 2) e reexpostos ao odor no teste EC1. Os animais do grupo “PTZ-não-pareado” receberam injeção de PTZ (15mg/kg) 10 min antes da sessão de familiarização (dia 1) e foram expostos ao odor de acetato de amila (5%, 250 μ L) na sessão de condicionamento olfatório (dia 2). O protocolo experimental utilizado encontra-se ilustrado em (A). A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ comparado aos demais grupos. Legenda: PTZ: pentilenotetrazol; EC1: estímulo condicionado 1; EC2: estímulo condicionado 2. n= 5-12.



5.1.2 Experimento 2: Avaliação do registro eletroencefalográfico após a administração sistêmica de pentilenotetrazol

Em relação aos dados obtidos com os registros de eletroencefalograma (EEG) das regiões hipocampus e corticais, ratos que receberam uma única injeção sistêmica de PTZ (15 mg/kg; n=6) apresentaram logo nos primeiros minutos maior incidência de ondas lentas de maior amplitude, similares a atividade teta e que podem assim estar relacionadas às respostas ansiogênicas (Duarte, Duzzioni et al., 2012) observadas (figura 15A e C). Além disso, a latência para esta atividade, similar ao ritmo *theta*, foi de $364,33 \pm 154,07$ s após a injeção de PTZ, com duração média de $3,83 \pm 0,40$ s e uma incidência total, ao longo dos 40 min, de $89,67 \pm 15,24$ disparos. Esses dados sugerem que a dose de PTZ (15 mg/kg) previamente utilizada na promoção do condicionamento olfatório e contextual aversivo possui efeito ansiogênico que inicia-se antes da exposição dos animais ao COA (latência de $364,33 \pm 154,07$ s).

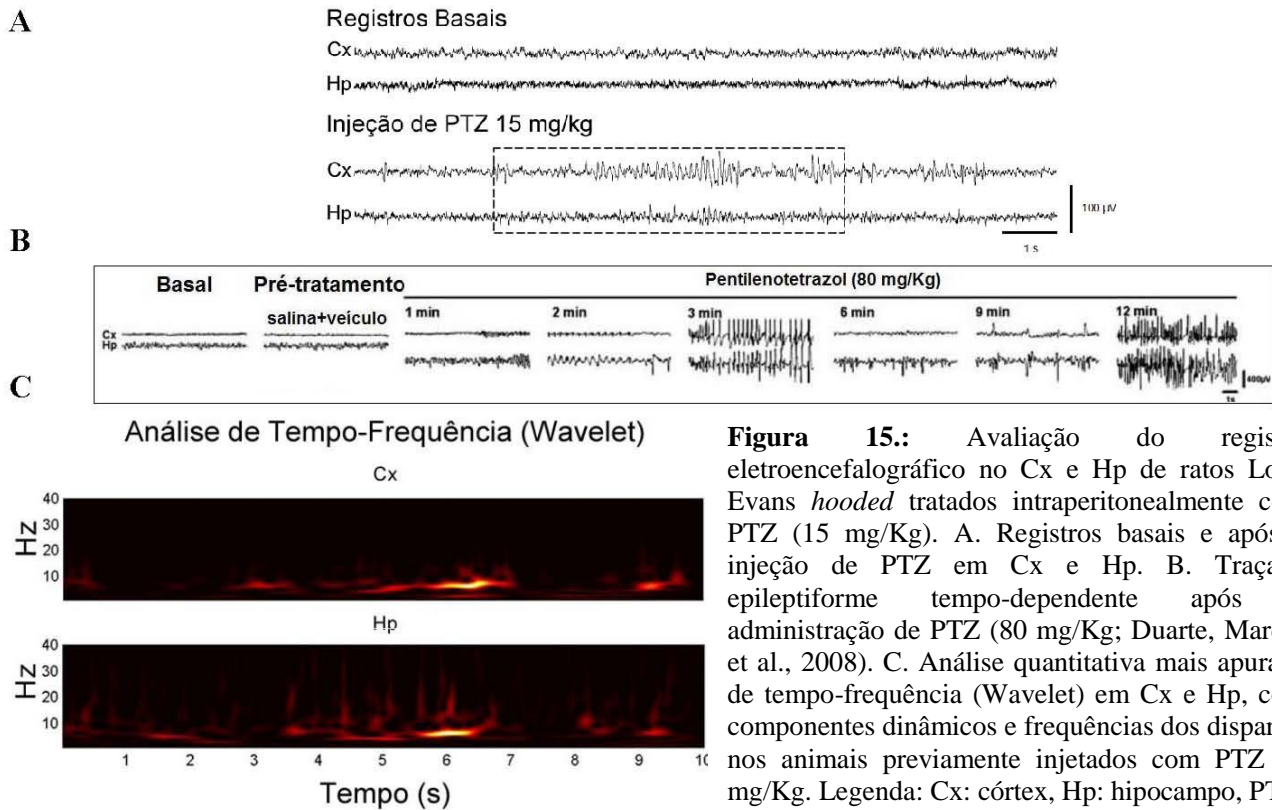
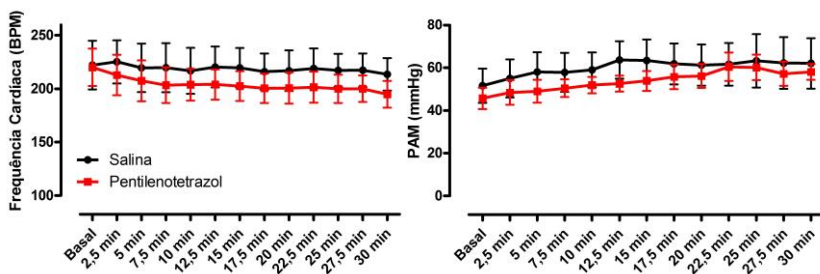


Figura 15.: Avaliação do registro eletroencefalográfico no Cx e Hp de ratos Long Evans *hooded* tratados intraperitonealmente com PTZ (15 mg/Kg). A. Registros basais e após a injeção de PTZ em Cx e Hp. B. Traçado epileptiforme tempo-dependente após a administração de PTZ (80 mg/Kg; Duarte, Marder et al., 2008). C. Análise quantitativa mais apurada de tempo-frequência (Wavelet) em Cx e Hp, com componentes dinâmicos e frequências dos disparos, nos animais previamente injetados com PTZ 15 mg/Kg. Legenda: Cx: córtex, Hp: hipocampo, PTZ: pentilenotetrazol. n=6.

5.1.3 Experimento 3: Avaliação dos parâmetros cardiovasculares após a administração sistêmica de pentilenotetrazol

Os dados referentes a este experimento encontram-se na figura 16. A ANOVA de medidas repetidas não detectou efeito significativo entre os grupos salina (n=3) e PTZ (n=4) para frequência cardíaca nos fatores tratamento [$F(1,5)= 0,3967$, $p=0,5429$], tempo [$F(1,5)=1,821$, $p=0,0520$] e interação [$F(1,5)= 0,4214$, $p=0,9525$]. Para pressão arterial média (PAM), embora o fator tempo tenha apresentado efeito significativo [$F(1,5)= 5,248$, $p< 0,0001$], o fator tratamento [$F(1,5)= 0,4140$, $p=0,5344$] e o fator interação [$F(1,5)= 0,6226$, $p=0,8196$] não apresentaram qualquer diferença. Estes resultados sugerem que o PTZ 15 mg/kg não causa efeitos cardiovasculares capazes de compor seu efeito aversivo como EI.

Figura 16.: Monitoramento cardíaco de frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) ao longo de 30 min de ratos previamente anestesiados com uretana (1,25g/Kg). Após a sedação completa, os animais foram administrados via intraperitoneal com salina ou PTZ (15 mg/Kg; i.p.). Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. Legenda: PTZ: pentilenotetrazol. n=3-4.

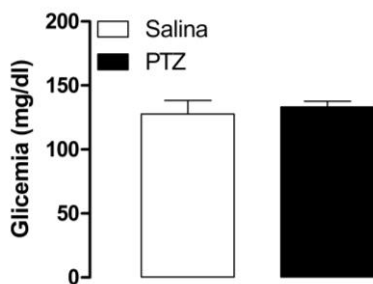


5.1.4 Experimento 4: Avaliação da glicemia após a administração sistêmica de pentilenotetrazol

A dosagem de glicemia não revelou nenhuma diferença significativa entre os grupos salina (n=5) e PTZ (n=7) para diferença nas taxas sanguíneas de glicemia [$F(1,10)=0,31$, $p=0,59166$], conforme pode ser observado na figura 17. Este dado sugere que, assim como observado no ensaio cardiovascular, o PTZ 15 mg/Kg não causa efeitos

hipo ou hiperglicemiantes capazes de compor seu efeito aversivo como EI.

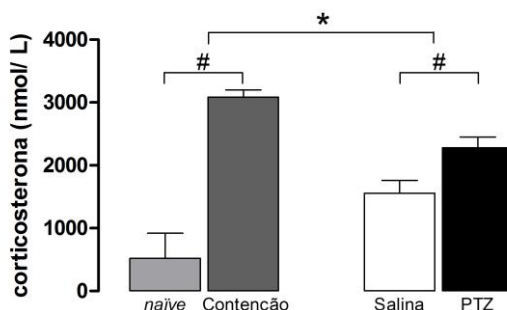
Figura 17.: Dosagem da glicemia de ratos injetados via i.p com salina ou PTZ (15 mg/Kg). A coleta da amostra e subsequente dosagem sérica ocorreram imediatamente após o condicionamento ao odor (12,5 min após a injeção intraperitoneal de salina ou PTZ). Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. Legenda: PTZ: pentilenotetrazol. n=5-7.



5.1.5 Experimento 5: Avaliação da corticosterona plasmática após a administração de pentilenotetrazol

Para a dosagem bioquímica de corticosterona nos grupos *home-cage* (n=4), salina (n=7), PTZ (n=8) e estressado por estresse de contenção (n=4), a ANOVA detectou diferença significativas [$F(3,19)=17,44$, $p<0,0001$]. O teste de *post hoc* mostrou a diferença significativa entre todos os grupos, conforme se pode observar na figura 18. Esses resultados demonstram o efeito do PTZ sob os níveis de corticosterona e sugerem que o efeito dessa droga como EI pode ser estar sendo modulado pela ação de glicocorticoides endógenos, como a corticosterona.

Figura 18.: Dosagem da corticosterona plasmática de ratos injetados via i.p com salina ou PTZ (15 mg/Kg). A coleta da amostra e subsequente dosagem sérica ocorreram 30 min após o condicionamento ao odor. O grupo *naïve* (controle negativo) permaneceu sempre na caixa moradia e o grupo contenção (controle positivo) foi submetido ao estresse de contenção por 20 min e, em seguida, as amostras de sangue foram coletadas. Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m.* $p < 0,05$ entre todos os grupos; # $p < 0,05$ entre os grupos *naïve* versus contenção e salina versus PTZ. Legenda: PTZ: pentilenotetrazol. n=4-8.



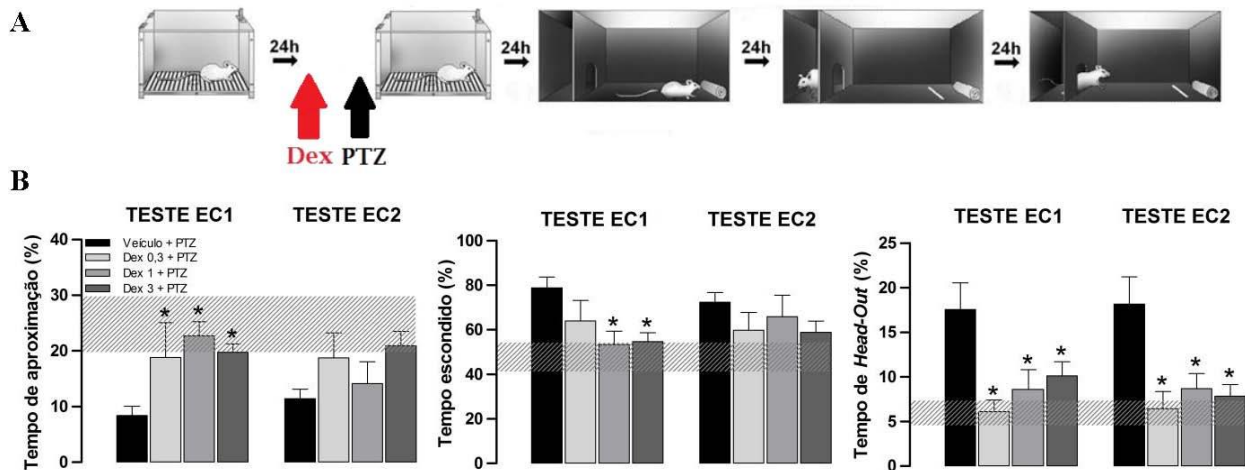
5.2 ETAPA II: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO AGONISTA GR, DEXAMETASONA, NA AQUISIÇÃO DO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO AVERSIVO PROMOVIDO PELO PENTILENOTETRAZOL

5.2.1 Experimento 6: Avaliação do efeito da dexametasona sob a aquisição do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol

O conjunto de dados obtidos nesta etapa experimental pode ser observado na figura 19. Os grupos experimentais são: veículo+PTZ (n=7), Dex 0,3 (0,3 mg/kg)+PTZ (n=7), Dex 1 (1 mg/kg)+PTZ (n=8) e Dex 3 (3 mg/kg)+PTZ (n=12). A ANOVA revelou efeito significativo para a porcentagem do tempo de aproximação para o fator tratamento subcutâneo no teste EC1 [$F(3,30)=3,55$, $p=0,02593$], mas não no teste EC2 [$F(3,30)=1,81$, $p=0,16644$] ou na familiarização [$F(3,30)=0,96$, $p=0,42496$]. Para a porcentagem de tempo escondido, a ANOVA detectou efeito significativo para o fator tratamento no teste EC1

[F(3,30)=3,74, $p=0,02153$], mas não no teste EC2 [F(3,30)=0,76, $p=0,51634$] ou na familiarização [F(3,30)=0,42, $p=0,73762$]. Para a porcentagem de tempo de *Head-out*, a ANOVA detectou diferença estatística significativa tanto no teste EC1 [F(3,30)=4,83, $p=0,00732$] como no teste EC2 [F(3,30)=6,73, $p=0,00132$], mas não na sessão de familiarização [F(3,30)=0,87, $p=0,46651$]. Para a porcentagem de tempo de aproximação no teste EC1 o teste *post hoc* revelou que todas as doses de Dex foram capazes de aumentar o tempo de aproximação em comparação com o grupo veículo. Para o teste EC2, nenhuma diferença foi observada. Para a porcentagem de tempo escondido no teste EC1 o teste *post hoc* revelou que as doses de 1 e 3 mg/kg de Dex foram capazes de diminuir a porcentagem de tempo escondido em relação ao grupo veículo. Para o teste EC2, nenhuma diferença foi observada. Para a porcentagem de tempo de *Head-out* no teste EC1 e no teste EC2 o teste *post hoc* revelou que todas as doses de Dex foram capazes de diminuir significativamente a porcentagem de tempo de *Head-out* em comparação com o grupo veículo.

Figura 19.: Avaliação da resposta defensiva nas sessões de teste EC1 e teste EC2 através dos parâmetros de (B) porcentagem de tempo de aproximação, porcentagem de tempo escondido e porcentagem de tempo de *Head-Out* dos animais injetados com PTZ (15mg/kg; i.p.; Trat. 1). Dez min antes da sessão de condicionamento ao odor de acetato de amila (EC1; 5%, 250 μ L) os ratos foram injetados com PTZ e, 60 min antes do condicionamento ao odor, os animais foram injetados com veículo ou Dex (Dex, 0,3; 1 ou 3 mg/Kg; s.c.; Trat. 2). A sessão de condicionamento olfatório teve duração de 2,5 min. A sessão de familiarização de todos os animais na caixa de odor está representada como intervalo de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. O protocolo experimental utilizado encontra-se ilustrado em (A). Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo+PTZ. $n = 7-12$ /grupo. Legenda: Dex: dexametasona; PTZ: pentilenotetrazol; EC1: estímulo condicionado 1; EC2: estímulo condicionado 2.

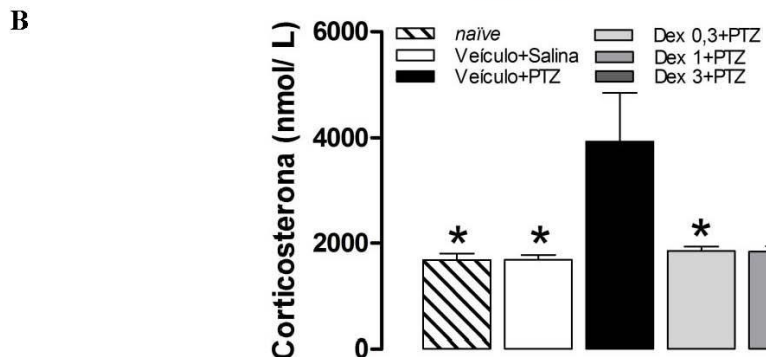
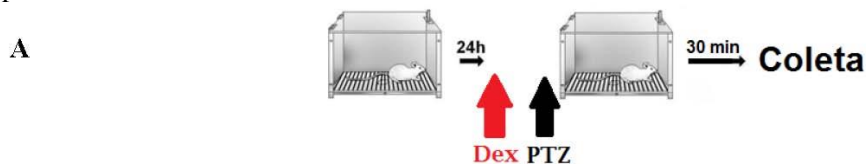


5.2.2 Experimento 7: Avaliação da corticosterona plasmática após a injeção de dexametasona na aquisição do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol

O conjunto de dados obtidos nesta etapa experimental pode ser observado na figura 20. Os grupos experimentais foram seis: *naïve* (n=5); veículo/salina (n=7); veículo/PTZ (n=4); Dex 0,3 mg/kg/PTZ (n=8); Dex 1 mg/kg/PTZ (n=7) e Dex 3 mg/kg/PTZ (n=5). Para a dosagem dos níveis de corticosterona periférica, a ANOVA detectou diferença significativa no tratamento [$F(5,30) = 9,633$, $p < 0,0001$]. O teste de *post-hoc* demonstrou que o grupo veículo/PTZ possuía níveis de corticosterona maiores que os demais grupos.

Em conjunto, os dados do experimento 6 e 7 sugerem que os baixos níveis de corticosterona periférica, causado pela supressão do eixo HPA por Dex, é o responsável por prejudicar a formação da memória aversiva condicionada ao odor (figura 19 e 20).

Figura 20.: Efeito do veículo ou da Dex sob a dosagem de corticosterona plasmática de ratos condicionados ao odor de acetato de amila (EC1; 5%, 250 μ L) com salina ou PTZ (15 mg/Kg; i.p.; B). Dez min antes da sessão de condicionamento, os ratos foram injetados com salina ou PTZ e, 60 min antes da sessão de condicionamento ao odor, os ratos foram injetados com veículo ou Dex (Dex 0,3; 1 ou 3 mg/Kg; s.c.). A sessão de condicionamento olfatório teve duração de 2,5 min. A coleta da amostra ocorreu 30 min após a sessão de condicionamento olfatório aversivo. O protocolo experimental utilizado encontra-se ilustrado em (A). Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo+PTZ. n= 4-8 Legenda: Dex: dexametasona; PTZ: pentilenotetrazol; EC1: estímulo condicionado 1; EC2: estímulo condicionado 2.



5.3 ETAPA III: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO AGONISTA GR, DEXAMETASONA, NA EXPRESSÃO DO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO AVERSIVO PROMOVIDO PELO PENTILENOTETRAZOL E NA AQUISIÇÃO DO CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL DE 2ª ORDEM

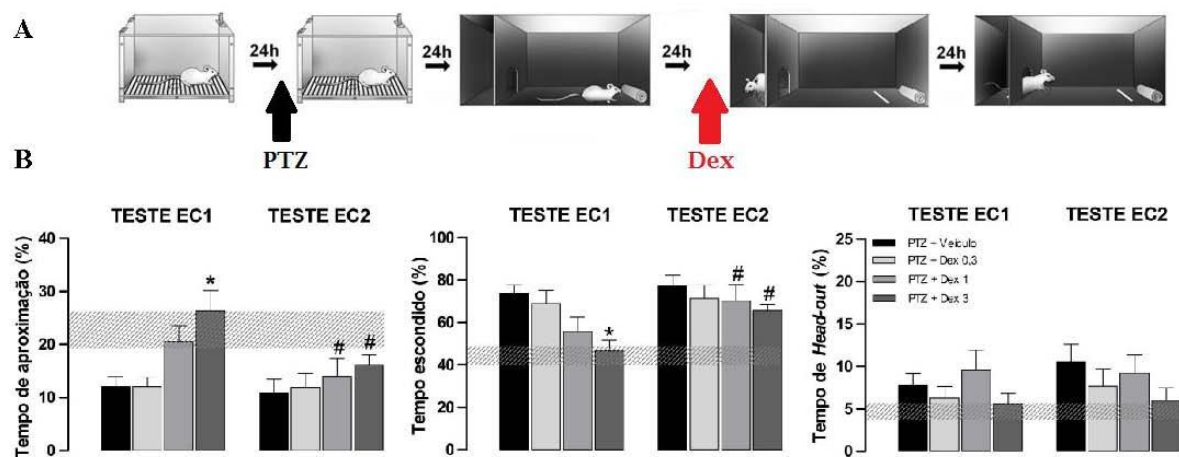
5.3.1 Experimento 8: Avaliação comportamental da dexametasona na expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol e na aquisição do condicionamento contextual aversivo de 2ª ordem

O conjunto de dados obtidos nesta etapa experimental pode ser observado na figura 21. Os grupos experimentais foram: PTZ+veículo (n=14), PTZ+Dex 0,3 mg/kg (n=12), PTZ+Dex 1 mg/kg (n=9) e PTZ+Dex 3 mg/kg (n=8). A ANOVA revelou, para a porcentagem do tempo de aproximação, efeito significativo no teste EC1 para o fator tratamento subcutâneo [$F(3,39)=7,63$, $p=0,00039$], mas não no teste EC2 [$F(3,39)=0,70$, $p=0,55703$] ou na familiarização [$F(3,39)=0,62$, $p=0,60855$]. Para a porcentagem de tempo escondido, a ANOVA revelou diferença significativa para o fator tratamento subcutâneo [$F(3,39)=4,60$, $p=0,00755$], mas não no teste EC2 [$F(3,39)=0,71$, $p=0,54955$] ou na familiarização [$F(3,39)=0,19$, $p=0,90225$]. Para a porcentagem de tempo de *Head-out*, a ANOVA não detectou nenhuma diferença significativa nas sessões de familiarização [$F(3,39)=1,62$, $p=0,20120$], teste EC1 [$F(3,39)=1,12$, $p=0,35403$] ou teste EC2 [$F(3,39)=0,90$, $p=0,45139$]. Para a porcentagem de tempo de aproximação e porcentagem de tempo escondido, no teste EC1, o teste de *post hoc* revelou que a dose de 3 mg/kg de Dex diminuiu significativamente a resposta defensiva (aumento da porcentagem de tempo de aproximação e diminuição da porcentagem de tempo escondido) em relação ao grupo controle (PTZ+veículo).

Baseado nas diferenças no perfil de resposta nas sessões de teste EC1 e teste EC2 nos grupos tratados com Dex se resolveu investigar tais diferenças. Para isso, realizou-se uma ANOVA de medidas repetidas entre as sessões de teste EC1 e teste EC2. Para a porcentagem de tempo de aproximação, a ANOVA revelou efeito significativo para o fator de tratamento subcutâneo [$F(3,39)=4,03$, $p=0,01376$], repetição [$F(1,39)=11,94$, $p=0,00134$] e interação entre os fatores tratamento subcutâneo e repetição [$F(3,39)=3,12$, $p=0,03678$]. Para a porcentagem de tempo escondido, a ANOVA revelou efeito significativo para o fator repetição [$F(1,39)=26,06$, $p=0,00001$] e interação entre os fatores

tratamento subcutâneo e repetição $F(3,39)=4,16$, $p=0,01200$], mas não para o fator tratamento subcutâneo [$F(3,39)=2,39$, $p=0,08339$]. Para a porcentagem de tempo de *Head-out*, nenhuma diferença foi observada para o fator tratamento subcutâneo [$F(3,39)=1,27$, $p=0,2970$], repetição [$F(1,39)=0,91$, $p=0,34669$] e interação entre os fatores tratamento subcutâneo e repetição $F(3,39)=0,42$, $p=0,74020$]. Para a porcentagem de tempo de aproximação e porcentagem de tempo escondido, o teste de *post hoc* revelou que as doses de 1 e 3 mg/kg de Dex são diferentes na sessão de teste EC1 e teste EC2. Nenhuma diferença foi detectada para a porcentagem de tempo de *Head-out*.

Figura 21.: Avaliação da resposta defensiva nas sessões de teste EC1 e teste EC2 através dos parâmetros de (B) porcentagem de tempo de aproximação, porcentagem de tempo escondido e porcentagem de tempo de *Head-Out* dos animais injetados intraperitonealmente com PTZ (15mg/kg; i.p.; Trat. 1). Dez min antes da sessão de condicionamento ao odor de acetato de amila (EC1; 5%, 250 μ L) os ratos foram injetados com PTZ e, 60 min antes do teste EC1, os animais foram injetados com veículo ou Dex (0,3; 1 ou 3 mg/Kg; s.c.; Trat. 2). A sessão de condicionamento olfatório teve duração de 2,5 min. A sessão de familiarização de todos os animais na caixa de odor está representada como intervalo de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. O protocolo experimental utilizado encontra-se ilustrado em (A). Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo PTZ+veículo; # $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo grupo na sessão de teste EC1. N=8-14. Legenda: Dex: dexametasona; PTZ: pentilenotetrazol; EC1: estímulo condicionado 1; EC2: estímulo condicionado 2.

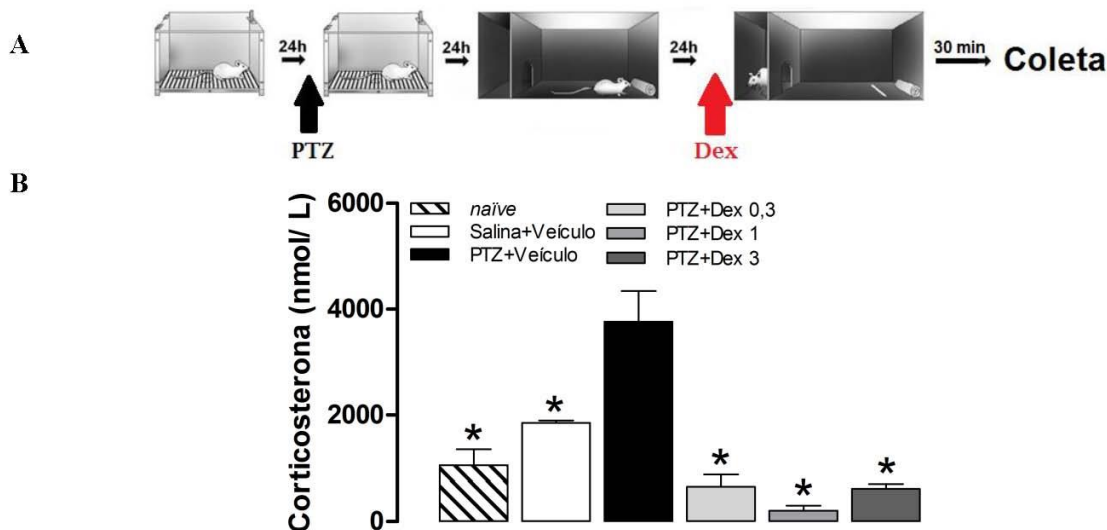


5.3.2 Experimento 9: Avaliação da corticosterona plasmática após a injeção de dexametasona na expressão do condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol e na aquisição do condicionamento contextual aversivo de 2ª ordem

O conjunto de dados obtidos nesta etapa experimental pode ser observado na figura 22. Os grupos experimentais foram seis: *naïve* (n=5); salina+veículo (n=6); PTZ+veículo (n=5); PTZ+Dex 0,3 (0,3 mg/kg; n=5); PTZ+ Dex 1 (1 mg/kg; n=6) e PTZ+ Dex 3 (3 mg/kg; n=6). Para a dosagem dos níveis de corticosterona periférica, a ANOVA detectou diferença significativa no tratamento [$F(5,27)= 24,21$, $p<0,0001$]. O teste de *post hoc* demonstrou que o grupo PTZ+veículo possuía níveis de corticosterona maiores que os demais grupos.

Em conjunto, os dados do experimento 8 e 9 sugerem que os baixos níveis de corticosterona periférica, causado pela supressão do eixo HPA por Dex, é o responsável por prejudicar a expressão da resposta defensiva relacionada ao odor condicionado (teste EC1). Entretanto, os dados sugerem também que estes mesmos baixos níveis de corticosterona não estejam envolvidos com a formação da memória contextual condicionada (condicionamento de 2ª ordem), uma vez que a expressão da resposta defensiva relacionada ao contexto condicionado não foi prejudicada pelo efeito da Dex (teste EC2; figura 21).

Figura 22.: Efeito do veículo ou da Dex sob a dosagem de corticosterona plasmática de ratos reexpostos ao odor de acetato de amila (EC1; 5%, 250 μ L) previamente condicionado com salina ou PTZ (15 mg/Kg; i.p.; B). Dez min antes da sessão de condicionamento, os ratos foram injetados com salina ou PTZ e, 60 min antes da sessão teste EC1, os ratos foram injetados com veículo ou Dex (0,3; 1 ou 3 mg/Kg; s.c.). A sessão de condicionamento olfatório teve duração de 2,5 min. A coleta da amostra ocorreu 30 min após a sessão de teste EC1. O protocolo experimental utilizado encontra-se ilustrado em (A). Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo PTZ+veículo. N=5-6. Legenda: Dex: dexametasona; PTZ: pentilenotetrazol; EC1: estímulo condicionado 1; EC2: estímulo condicionado 2.

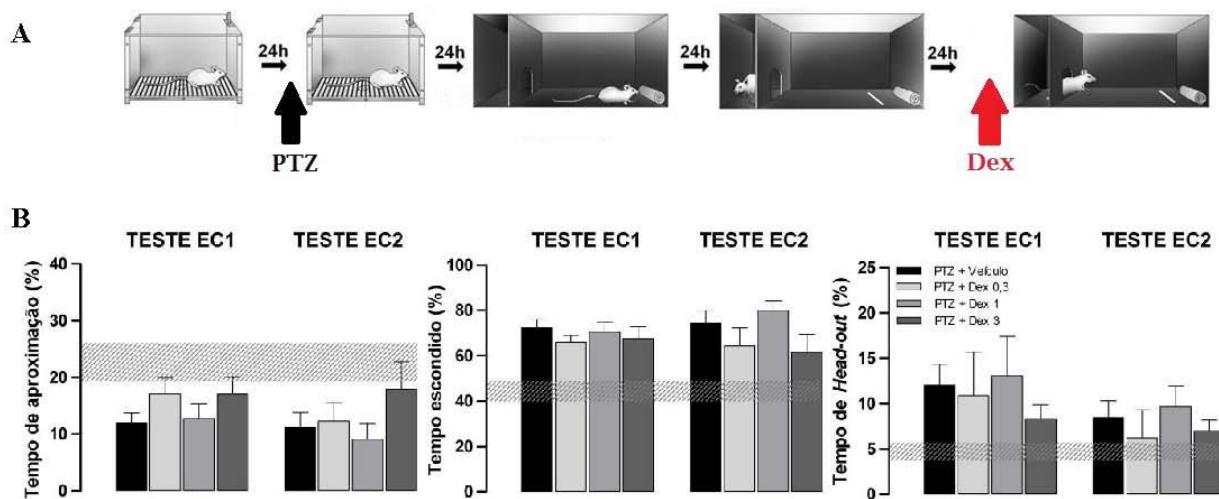


5.4 ETAPA IV: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO AGONISTA GR, DEXAMETASONA, NA EXPRESSÃO DO CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL AVERSIVO DE 2ª ORDEM

5.4.1 Experimento 10: Avaliação comportamental da dexametasona na expressão condicionamento contextual aversivo (CCA) de 2ª ordem

O conjunto de dados obtidos nesta etapa experimental pode ser observado na figura 23. Os grupos experimentais foram: PTZ+veículo (n=11), PTZ+Dex 0,3 mg/kg (n=6), PTZ+Dex 1 mg/kg (n=7) e PTZ+Dex 3 mg/kg (n=10). A ANOVA não detectou nenhuma diferença significativa para o parâmetro de porcentagem de tempo de aproximação, tanto na familiarização [$F(3,30)=1,44$, $p=0,25126$], teste EC1 [$F(3,30)=1,12$, $p=0,35688$] como no teste EC2 [$F(3,30)=1,13$, $p=0,35174$]. Para a porcentagem de tempo escondido, a ANOVA também não detectou quaisquer diferenças na familiarização [$F(3,30)=2,82$, $p=0,05585$], teste EC1 [$F(3,30)=0,41$, $p=0,74470$] ou teste EC2 [$F(3,30)=1,56$, $p=0,21948$]. Para a porcentagem de tempo de *Head-out*, a ANOVA também não detectou diferenças na sessão de familiarização [$F(3,30)=0,63$, $p=0,60443$], teste EC1 [$F(3,30)=0,50$, $p=0,68525$] ou teste EC2 [$F(3,30)=0,49$, $p=0,69409$].

Figura 23.: Avaliação da resposta defensiva nas sessões de teste EC1 e teste EC2 através dos parâmetros de (B) porcentagem de tempo de aproximação, porcentagem de tempo escondido e porcentagem de tempo de *Head-Out* dos animais injetados sistemicamente com PTZ (15mg/kg; i.p.; Trat. 1). Dez min antes da sessão de condicionamento ao odor de acetato de amila (EC1; 5%, 250 μ L) os ratos foram injetados com PTZ e, 60 min antes do teste EC2, os animais foram injetados com veículo ou Dex (0,3; 1 ou 3 mg/Kg; s.c.; Trat. 2). A sessão de condicionamento olfatório teve duração de 2,5 min. A sessão de familiarização de todos os animais na caixa de odor está representada como intervalo de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. O protocolo experimental utilizado encontra-se ilustrado em (A). Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. n=6-11. Legenda: Dex: dexametasona; PTZ: pentilenotetrazol; EC1: estímulo condicionado 1; EC2: estímulo condicionado 2.

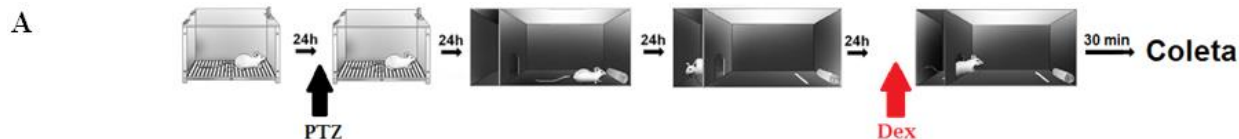


5.4.2 Experimento 11: Avaliação da corticosterona plasmática após a injeção de dexametasona na expressão do condicionamento contextual aversivo de 2ª ordem

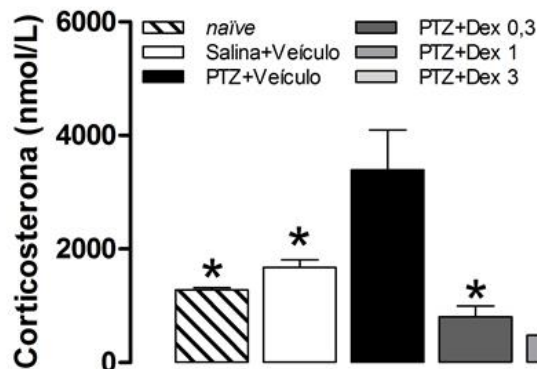
O conjunto de dados obtidos nesta etapa experimental pode ser observado na figura 24. Os grupos experimentais foram seis: *naïve* (n=4); salina+veículo (n=6); PTZ+veículo (n=2); PTZ+ Dex 0,3 (0,3 mg/kg; n=5); PTZ+Dex 1 (1 mg/kg; n=9) e PTZ+Dex 3 (3 mg/kg; n=3). Para a dosagem dos níveis de corticosterona periférica, a ANOVA detectou diferença significativa no tratamento [$F(5,23)= 23,02$, $p<0,0001$]. O teste de *post hoc* demonstrou que o grupo PTZ+veículo possuía níveis de corticosterona maiores que os demais grupos.

Em conjunto, os dados do experimento 10 e 11 demonstram que os baixos níveis de corticosterona periférica, causado pela supressão do eixo HPA por Dex, não é capaz de prejudicar a expressão da resposta defensiva relacionada ao contexto condicionado (condicionamento de 2ª ordem; figura 23). Este resultado sugere que a expressão da resposta defensiva relacionada ao condicionamento contextual de 2ª ordem não é modulada por corticosterona.

Figura 24.: Efeito da Dex sob a dosagem de corticosterona plasmática de ratos reexpostos ao odor de acetato de amila (EC1; 5%5 , 250 μ L) previamente condicionado com salina ou PTZ (15 mg/Kg; i.p.; B). Dez min antes da sessão de condicionamento, os ratos foram injetados com salina ou PTZ e, 60 min antes da sessão teste EC2, os ratos foram injetados com veículo ou Dex (0,3; 1 ou 3 mg/Kg; s.c.). A sessão de condicionamento olfatório teve duração de 2,5 min. A coleta da amostra ocorreu 30 min após a sessão de teste EC2. O protocolo experimental utilizado encontra-se ilustrado em (A). Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo/PTZ. $n = 2-9$. Legenda: Dex: dexametasona; PTZ: pentilenotetrazol; EC1: estímulo condicionado 1; EC2: estímulo condicionado 2.



B



5.5 ETAPA V: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO AGONISTA GR, DEXAMETASONA, NA EXPRESSÃO DO CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO AVERSIVO PROMOVIDO PELO PENTILENOTETRAZOL E NA EXPRESSÃO DO CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL DE 2ª ORDEM

5.5.1 Experimento 12: Efeito comportamental da dupla administração de dexametasona na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na expressão do condicionamento contextual de 2ª ordem

O conjunto de dados obtidos nesta etapa experimental pode ser observado na figura 25. Os grupos experimentais foram: PTZ+veículo+veículo (n=8), PTZ+veículo+Dex 3 (3 mg/kg; n=7), PTZ+Dex 3 (3 mg/kg)+veículo (n=6) e PTZ+Dex 3 (3 mg/kg)+Dex 3 (3 mg/kg; n=9). Para a porcentagem de tempo de aproximação, no teste EC1, a ANOVA fatorial revelou efeito significativo para o tratamento subcutâneo 1 [$F(1,26)=34,50$, $p=0,00000$]. No teste EC2, a ANOVA detectou efeito significativo pra o tratamento subcutâneo 2 [$F(1,26)=6,38$, $p=0,01798$]. Para a reexposição ao EC1, nenhuma diferença significativa foi observada. Para a porcentagem de tempo escondido, no teste EC1, a ANOVA fatorial detectou diferença significativa para o tratamento subcutâneo 1 [$F(1,26)=38,93$, $p=0,00000$]. No teste EC2, a ANOVA detectou diferença significativa para o tratamento subcutâneo 2 [$F(1,26)=4,42$, $p=0,04542$]. Na reexposição ao EC1, nenhuma diferença significativa foi detectada. Para a porcentagem de tempo de *Head-out*, nenhuma diferença significativa foi observada na sessão de teste EC1, porém na sessão de teste EC2 houve diferença significativa para o tratamento subcutâneo 1 [$F(1,26)=6,92$, $p=0,01415$] e para o fator interação entre o tratamento subcutâneo 1 x tratamento subcutâneo 2 [$F(1,26)=5,16$, $p=0,03167$]. No teste EC1, o teste de *post hoc* demonstrou diferença para a porcentagem de tempo de aproximação entre os grupos PTZ+Dex 3mg/kg+veículo *versus* PTZ+veículo+veículo e PTZ+Dex 3mg/kg+Dex 3mg/kg *versus* PTZ+veículo+veículo. No teste EC2, o teste *post-hoc* revelou diferença entre os grupos PTZ+Dex 3mg/kg+veículo e PTZ+Dex 3mg/kg+Dex 3 mg/kg. Para a porcentagem de tempo escondido, no teste EC1, o teste de *post hoc* revelou diferença entre o grupo PTZ+veículo+veículo x todos os demais (PTZ+veículo+Dex 3 mg/kg, PTZ+Dex 3 mg/kg +veículo e

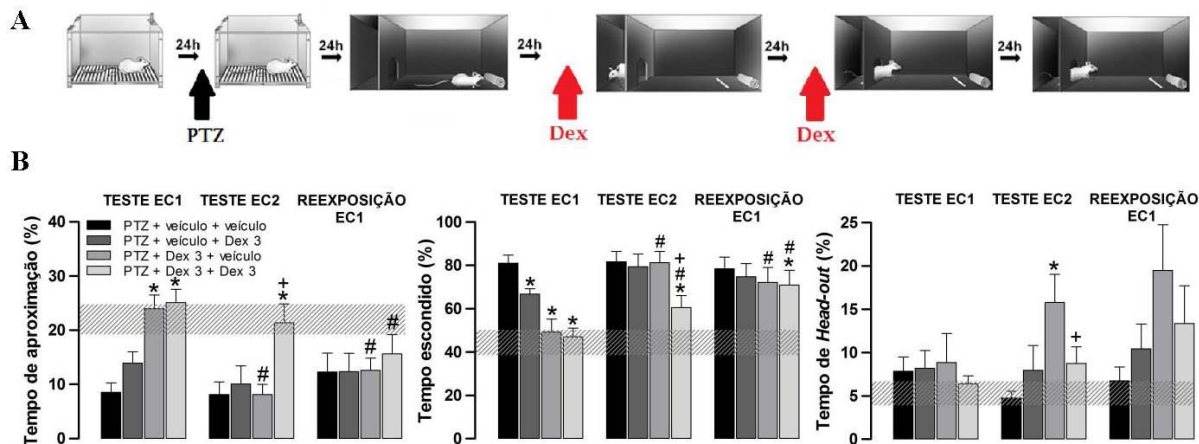
PTZ+ Dex 3 mg/kg +Dex 3 mg/kg). No teste EC2, a diferença detectada foi entre os grupos PTZ+Dex 3mg/kg+veículo e PTZ+Dex 3mg/kg+Dex 3 mg/kg. Para a porcentagem de tempo de *Head-out*, não houve quaisquer diferenças na sessão de teste EC1, no entanto na sessão de teste EC2 o teste de *post hoc* revelou diferença entre os grupos PTZ+Dex 3mg/kg+veículo e PTZ+Dex 3mg/kg+Dex 3 mg/kg *versus* PTZ+veículo+veículo.

Observada diferenças entre as sessões de teste EC1, teste EC2 e reexposição ao EC1, resolveu-se investigar onde se encontravam estas diferenças. Para isso, realizou-se uma ANOVA de medidas repetidas incluindo as 3 sessões de teste. Para a porcentagem de tempo de aproximação observou-se efeito significativo para o fator tratamento subcutâneo 1 [$F(1,26)=8,20$, $p=0,00817$], repetição [$F(2,52)=9,56$, $p=0,00029$], repetição e tratamento subcutâneo 1 [$F(2,52)=8,29$, $p=0,00075$] e repetição, tratamento subcutâneo 1 e tratamento subcutâneo 2 [$F(2,52)=3,71$, $p=0,03110$]. Para a porcentagem de tempo escondido, observaram-se diferenças significativas para os fatores tratamento subcutâneo 1 [$F(1,26)=9,38$, $p=0,00505$], repetição [$F(2,52)=16,65$, $p=0,00000$], repetição e tratamento subcutâneo 1 [$F(2,52)=7,65$, $p=0,00123$] e repetição, tratamento subcutâneo 1 e tratamento subcutâneo 2 [$F(2,52)=3,88$, $p=0,02695$]. Para a porcentagem de tempo de *Head-out*, a ANOVA detectou diferenças significativas para o fator tratamento subcutâneo 1 [$F(1,26)=5,07$, $p=0,03298$], repetição [$F(2,52)=4,05$, $p=0,02321$] e repetição e tratamento subcutâneo 1 [$F(2,52)=3,28$, $p=0,04551$]. Para a porcentagem de tempo de aproximação, o teste de *post hoc* revelou que o grupo PTZ+Dex 3 mg/kg+veículo possui diferenças no comportamento expresso na sessão de teste EC1, teste EC2 e reexposição ao EC1. O grupo PTZ+Dex 3 mg/kg+Dex 3 mg/kg possui resposta defensiva diferente entre as sessões de teste EC1 e reexposição ao EC1. Para a porcentagem de tempo escondido, o teste de *post hoc* revelou diferença entre as respostas defensivas exibidas no teste EC2 e reexposição ao EC1 em comparação ao teste EC1 nos grupos PTZ+Dex 3 mg/kg+veículo e PTZ+Dex 3 mg/kg+Dex 3 mg/kg. Para a porcentagem de tempo de *Head-out*, o teste de *post hoc* revelou diferença significativa entre as sessões de teste EC1 e reexposição ao EC1 apenas no grupo PTZ+Dex 3 mg/kg+veículo.

Os dados no experimento 12 sugerem que a expressão da resposta defensiva relacionada ao contexto condicionado de 2ª ordem é dependente dos níveis de corticosterona presentes durante a formação da

memória aversiva condicionada ao contexto (condicionamento de 2ª ordem), uma vez que a expressão da resposta defensiva relacionada ao contexto condicionado de 2ª ordem foi prejudicada apenas quando o eixo HPA foi suprimido por Dex durante a aquisição do condicionamento contextual aversivo (figura 25).

Figura 25.: Avaliação da resposta defensiva nas sessões de teste EC1 e teste EC2 através dos parâmetros de (B) porcentagem de tempo de aproximação, porcentagem de tempo escondido e porcentagem de tempo de *Head-Out* dos animais condicionados ao odor de acetato de amila (EC1; 5%, 250 μ L) com PTZ (15mg/kg; i.p.; 10 min antes; Trat. 1). Sessenta min antes de ambas as sessões (teste EC1 e teste EC2), os animais foram injetados com veículo ou Dex (3 mg/Kg; s.c.; Trat. 2). O protocolo experimental utilizado encontra-se ilustrado em (A). Os valores encontram-se expressos pela média \pm e.p.m. A sessão de familiarização de todos os animais está representada como intervalo de confiança (95%) superior e inferior pela barra horizontal. * $p < 0,05$ comparado ao grupo PTZ+veículo+veículo; # $p < 0,05$ comparado ao seu respectivo grupo na sessão de teste EC1; + $p < 0,05$ comparado ao grupo PTZ+Dex 3 mg/Kg+veículo na sessão de teste EC2. n= 6-9. .Legenda: Dex: dexametasona; PTZ: pentilenotetrazol; EC1: estímulo condicionado 1; EC2: estímulo condicionado 2.



VI. DISCUSSÃO

O PTZ é um protótipo de droga ansiogênica, utilizado como ferramenta em testes animais de ansiedade (LAL & EMMETT-OGLESBY, 1983; JUNG, LAL et al., 2002) e de epilepsia (para revisão, ver LÖSCHER, 2011). Trata-se de um antagonista não competitivo do receptor GABA_A (BHATTACHARYA, KISHOR et al., 1964; SEJIMA, ITO et al., 1997) que foi inicialmente descrito como “cardiazol” ou “metrazol” (estimulante cardíaco) e que em altas doses apresentou efeitos panicogênicos em animais (SCHENBERG, BITTENCOURT et al., 2001) e convulsivante em humanos (RODIN, 1958; RODIN & CALHOUN, 1970). Posteriormente, observou-se que em doses sub-convulsivantes o PTZ foi capaz de causar ansiedade intensa (RODIN, 1958; RODIN & CALHOUN, 1970; SCHENBERG, BITTENCOURT et al., 2001). Buscou-se confirmar o efeito ansiogênico do PTZ na dose utilizada (15 mg/kg; i.p.) através do registro eletroencefalográfico nas regiões de córtex e hipocampo, áreas sabidamente envolvidas com o processamento de memórias aversivas (DO MONTE, CANTERAS et al., 2008, 2010; KROON, 2012). A partir dos resultados obtidos do EEG foi possível obter as seguintes informações: a) a injeção sistêmica de PTZ apresenta ativação no córtex e hipocampo, com latência para o primeiro disparo (medida da atividade elétrica no EEG) de $6,07 \pm 2,57$ min; e b) os disparos observados no EEG são caracterizados como ondas lentas de alta voltagem, interpretadas como ondas não-convulsivantes (FILE, CURLE et al., 1987; WONG, WOZNIAK et al., 2003, KOBAYASHI, OKA et al., 2005). Assim, esses resultados confirmaram que os animais injetados sistemicamente com PTZ na dose de 15 mg/Kg e que, dez minutos após essa administração sistêmica foram colocados em contato com o odor a ser condicionado (acetato de amila), estavam sob efeito central da droga durante o período do COA (2,5 min). Essa evidência corrobora achados prévios da literatura que demonstram o perfil ansiogênico do PTZ nesta dose (DE SOUZA, SCHENBERG et al., 1998; WONG, WOZNIAK et al., 2003; CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005).

Para ser considerado um EI em um modelo de condicionamento, o estímulo aplicado deve possuir relevância aversiva emocional e/ou biológica (BAKER & KIM, 2004; SCHAFF, BAUER et al., 2005) capaz de promover respostas defensivas. Em termos de ativação de estruturas centrais relacionadas com a evocação e a expressão de respostas defensivas, a natureza do EI é capaz de ativar estruturas

encefálicas específicas. Observou-se que quando ratos foram condicionados ao estímulo olfatório utilizando choque nas patas, a expressão da resposta defensiva frente à evocação da memória previamente condicionada ao odor ativou principalmente neurônios da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPd), enquanto que quando ratos foram condicionados ao odor através do efeito promovido pelo PTZ, a expressão da resposta defensiva frente à evocação da memória previamente condicionada ao odor recrutou prioritariamente neurônios do córtex cingulado anterior (CCA; dados não mostrados). Com base nessas informações que dão suporte às particularidades inerentes a naturezas diferentes de condicionamentos aversivos e a possibilidade de haver outros efeitos fisiológicos causados pela administração sistêmica do PTZ (e não dos controles injetados com salina, Anexo A), parâmetros orgânicos como níveis de glicose sanguínea, níveis plasmáticos de corticosterona e/ou parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) foram investigados com o intuito de observar qual/quais outros sistemas estariam compondo o efeito aversivo do PTZ como EI neste modelo.

Sabe-se que oscilações extremas e frequentes entre hipo e hiperglicemia têm sido relacionadas a estados de ansiedade (EIBER & BERLIN, 1997). Estudos epidemiológicos demonstram uma alta prevalência de transtornos psiquiátricos entre pacientes diabéticos que apresentam essas oscilações recorrentes, em particular transtornos de ansiedade e humor (EIBER & BERLIN, 1997). Da mesma forma, evidências na literatura mostram que desbalanços cardiovasculares podem estar diretamente relacionados aos processos de formação de memórias emocionais. Soeter e Kindt (2011) demonstraram em humanos que o aumento da liberação de noradrenalina durante ou imediatamente após um evento estressor fortalece a formação do medo associativo em traços de memória. Pavesi e Carobrez (2011, dados não publicados) mostraram em ratos que a administração sistêmica de isoproterenol, um agonista seletivo dos receptores β_1 -adrenérgico, antes da exposição a um odor neutro foi capaz de promover o COA. Entretanto, no presente estudo, nem os níveis glicêmicos, nem os parâmetros cardiovasculares evidenciaram alterações significativas entre os animais condicionados ao odor com salina ou PTZ.

Uma vez em contato com uma fonte de perigo, ameaça ou situação desagradável os organismos recrutam mecanismos comportamentais e neuroendócrinos de defesa para se proteger e reduzir possíveis danos ao indivíduo. Nestas situações, hormônios como o CRH, ACTH e o hormônio glicocorticoide cortisol/corticosterona são liberados e exercerão suas funções em seus pontos-alvo. Uma vez

liberada na corrente sanguínea, a corticosterona é capaz de sinalizar estados de estresse e afetar os processos de memória (McEWEN, 2003). Sabendo da natureza aversiva do PTZ na dose utilizada, optou-se por quantificar os níveis plasmáticos de corticosterona 30 min após a administração do PTZ. Este tempo foi selecionado porque trabalhos anteriores demonstraram que o pico máximo de corticosterona após um evento estressor é de 30 min (DE KLOET, 2010). O resultado da dosagem mostrou um aumento significativo nos níveis de corticosterona plasmática nos animais injetados com PTZ em relação àqueles injetados com salina, corroborando a natureza aversiva do PTZ. A partir desses resultados foi que se hipotetizou a possível influência dos níveis de corticosterona na modulação do aprendizado aversivo promovido pelo PTZ.

Evidências na literatura têm mostrado que a modulação dos receptores MR e GR influenciam comportamentos relacionados à ansiedade e à memória emocional formada a partir da experiência emocional aversiva. Estes comportamentos estão relacionados ao sistema límbico e fazem parte do repertório comportamental testado em modelos de memória espacial e condicionamentos aversivos (DE KLOET, OITZL et al., 1999). Frente aos resultados experimentais obtidos em seu trabalho, Oitzl e colaboradores (1997) sugeriram que os receptores MR seriam os responsáveis pelos efeitos facilitatórios imediatos da corticosterona na aquisição da memória, enquanto que a modulação de memórias espaciais e aversivas requereria a participação dos receptores GR. Esta sugestão vai ao encontro dos resultados obtidos pelo presente trabalho na aquisição do COA, uma vez que se observou que a injeção do agonista GR, Dex, 60 min antes da sessão de condicionamento olfatório aversivo, foi capaz de prevenir o aumento das respostas de esquiva e avaliação de risco na reexposição ao odor condicionado. Esse resultado evidenciou a participação do sistema glicocorticoide no processamento de formação da memória aversiva a partir do estímulo interoceptivo PTZ.

Carroll e colaboradores (1981) descrevem a Dex como um glicocorticoide sintético potente, base farmacológica do “teste de supressão do eixo HPA por dexametasona”. Este teste se baseia na ação central da Dex, uma vez que este fármaco exerce intensa retroalimentação negativa sobre a liberação de ACTH na hipófise. Evidências comportamentais relacionadas à desbalanços nos níveis de glicocorticoides surgiram a partir do aprendizado revelado nas respostas de esquiva passiva. Observou-se que este comportamento defensivo aumentava após a administração sistêmica de adrenalina e que a eficácia

da adrenalina era reduzida em até um milhão de vezes após o tratamento com baixas doses de corticosterona, mas não de Dex. Para os autores do estudo (BORRELL, DE KLOET et al., 1984) este efeito se devia seletivamente aos receptores MR. A relação dos corticosteroides com os comportamentos emocionais foi então aceito depois da metade do século XIX, quando Mechiel Korte demonstrou em seus experimentos que ambos os receptores glicocorticoides mediavam aspectos particulares da ansiedade. Enquanto os receptores MR pareciam ter efeitos ansiolíticos, os componentes cognitivos do condicionamento aversivo estavam relacionados aos receptores GR (KORTE, DE BOER et al., 1995). Assim, com base nos resultados comportamentais e bioquímicos obtidos se sugere que para que o COA possa se estabelecer é necessário níveis de corticosterona circulante suficientes para que ocorra o processamento da memória aversiva aprendida de maneira adequada, de modo que reduções significativas nesses níveis, como àquela promovidas pela Dex, são capazes de prejudicar a formação da memória aversiva aprendida. Em virtude da supressão do eixo HPA por Dex, com consequente redução dos níveis de corticosterona circulante, ocorreu um prejuízo no processamento de formação da memória aversiva. Esse dano ocorreu, segundo nossa hipótese, pela sucessão inadequada de eventos centrais necessários para a formação adequada da memória aversiva a qual, em última análise culminaria na existência de um comportamento adaptativo no futuro.

Estudos na literatura demonstram que o estresse induz prejuízos de memória quando a retenção é testada pouco tempo após o aprendizado (antes do término da fase de consolidação) e os níveis de glicocorticoides ainda estão elevados (DIAMOND, FLESHNER et al., 1996; KIRSCHBAUM, WOLF et al., 1996). Esta informação demonstra a participação dos glicocorticoides nos processos de evocação da memória. De Quervain e colaboradores (1998) investigaram especificamente o efeito do estresse e dos glicocorticoides na evocação da memória espacial de longa duração. Neste estudo se observou que, os animais apresentaram prejuízo na evocação da memória espacial previamente adquirida no modelo do labirinto aquático quando o estresse foi causado pelos choques nas patas, ou por injeção sistêmica de corticosterona em ratos não estressados, 30 min antes do teste de evocação da memória. Este resultado corrobora Diamond e colaboradores (1996) e Kirschbaum e colaboradores (1996) com relação aos prejuízos causados pelo nível elevado de corticosterona/cortisol, respectivamente, na evocação. Ainda, De Quervain e colaboradores (1998) demonstraram que o desempenho da evocação não foi

prejudicado quando o estresse causado pelos choques nas patas foi realizado 2 min ou 4 h antes do teste de evocação da memória, mostrando a relação tempo-dependente entre os níveis de corticosterona e o prejuízo na evocação da memória. Portanto, segundo os autores, esse efeito tempo-dependente nos processos de evocação correspondem aos níveis de corticosterona circulante no momento do teste. De Quervain e colaboradores (1998) mostraram também a participação específica dos receptores GR nos processos de evocação da memória. Através da supressão da síntese de corticosterona com metirapone (antagonista seletivo dos receptores GR), observou-se um bloqueio no prejuízo na retenção da memória induzida pelo estresse. Em conjunto, esses resultados suportam a ideia de que níveis muito altos de corticosterona afetam além dos processos de aquisição e consolidação (como já bem documentado na literatura), a evocação da memória (DE QUERVAIN, ROOZENDAAL et al., 1998).

Assim como ocorre com níveis muito elevados, níveis excessivamente baixos de corticosterona também estão associados a prejuízos nos processos de memória. Ratos adrenalectomizados demonstraram déficits de aprendizado e memória em tarefas envolvendo o hipocampo (SPANSWICK, EPP et al., 2007). Nesta mesma situação fisiológica (adrenalectomia), o mesmo aconteceu com a memória de trabalho dependente do córtex pré-frontal (MIZOGUCHI, ISHIGE et al., 2004). Utilizando o agonista GR, Dex, os efeitos na retenção da memória normalmente estão relacionados ao momento da administração. Dados prévios do nosso laboratório demonstram que a Dex administrada imediatamente após um condicionamento aversivo olfatório fraco é capaz de potencializar a formação da memória emocional condicionada (SOUZA, 2011). Esse efeito também foi observado em condicionamentos apetitivos (ZORAWSKI & KILLCROSS, 2002). Entretanto, quando a Dex foi administrada 60 min antes (SOUZA, 2011) ou 30 min antes (RASHIDY-POUR, SADEGHI et al., 2004) da evocação da memória, foi observado um prejuízo na expressão da resposta defensiva. Estes dados corroboram os resultados obtidos no presente trabalho, ao se verificar que os níveis muito baixos de corticosterona circulante, devido à supressão do eixo HPA pela Dex, foram capazes de prejudicar a expressão da resposta defensiva de ratos condicionados ao odor com PTZ. Entretanto, verificou-se que este prejuízo não foi capaz de impedir a aquisição do CCA de 2ª ordem durante o teste EC1, uma vez que estes animais apresentaram um aumento na resposta defensiva de esquiva quando foram reapresentados ao contexto, sem odor, no dia seguinte. Este resultado levantou a

possibilidade de que este efeito sob a aquisição do CCA de 2ª ordem seja devido a uma dependência de estado relativa ao efeito da Dex nos animais. Neste sentido, para testar essa hipótese realizou-se um experimento suprimindo o eixo HPA em ambos os momentos, no mesmo animal experimental: antes da expressão da resposta defensiva frente ao odor condicionado (teste EC1) e antes da expressão da resposta defensiva frente ao contexto condicionado (teste EC2). Conforme observado pelos resultados do presente trabalho, a Dex foi capaz de causar um prejuízo na expressão da resposta defensiva frente ao odor e ao contexto nesta situação. Este resultado mostra o efeito farmacológico da Dex sob a expressão da resposta defensiva frente a ambos os ECs, sem interferir com a evocação. Entretanto, é importante ressaltar que, para que este prejuízo aconteça, a aquisição do condicionamento de 2ª ordem (e a expressão da resposta defensiva) precisa, necessariamente, ter sido prejudicada frente ao odor condicionado (EC1), pois quando a supressão do eixo HPA é realizada (por efeito da Dex) apenas frente ao contexto condicionado (teste EC2) não há qualquer prejuízo na expressão do comportamento defensivo. Em outras palavras, para que a aquisição e a expressão do condicionamento de 2ª ordem fossem prejudicadas pela supressão o eixo HPA induzido por Dex, o animal precisou apresentar essa queda de corticosterona em ambos os momentos [formação da memória aversiva relacionada ao EC2 e expressão da resposta defensiva na reexposição a este estímulo (EC2)]. Este efeito pode ser explicado considerando que, quando a Dex prejudica a expressão da resposta defensiva frente ao odor (1º estímulo condicionado), há um enfraquecimento na valência emocional aversiva do contexto (2º estímulo condicionado), embora esta diminuição não seja suficiente para impedir a aquisição do condicionamento aversivo relativo ao 2º estímulo condicionado, uma vez que a expressão da resposta defensiva relacionada ao contexto condicionado acontece no dia seguinte. Em contrapartida, quando o animal é reexposto ao odor no teste EC1 sem a redução nos níveis de corticosterona promovido pela Dex, o condicionamento aversivo de 2ª ordem se estabelece com valência emocional aversiva suficiente para impedir que, no dia seguinte, essa mesma queda nos níveis de corticosterona seja capaz de prejudicar a expressão da resposta defensiva relacionada ao contexto. Estas particularidades observadas no modelo experimental utilizado sugerem que os processos envolvidos na modulação de condicionamentos de ordens elevadas (como é o caso do condicionamento de 2ª ordem) provavelmente envolvam outras estruturas e/ou circuitos cerebrais diferentes daqueles ativados no

condicionamento aversivo de 1ª ordem. Esta sugestão corrobora os estudos prévios da literatura que mostram que, embora os condicionamentos de 1ª e 2ª ordem compartilhem características comuns (ex.: há formação de uma nova memória), alguns pontos de cada ordem de condicionamento são particulares. Gewirtz e Davis (2000) abordaram em sua revisão sobre condicionamento aversivo em ordens elevadas, algumas características particulares de cada condicionamento, enfatizando suas diferenças. Uma dessas diferenças é que em virtude do EC2 nunca entrar em contato com o EI, sua valência emocional aversiva é intrinsecamente menor que a do EC1. Estes autores também relatam que no condicionamento aversivo de 1ª ordem a magnitude aversiva é dependente do EI, enquanto que no condicionamento aversivo de 2ª ordem esta magnitude é dependente do EC1. Entretanto, um artigo mais recente (PARKES & WESTBROOK, 2010) mostrou através da inativação temporária na amígdala basolateral (BLA), do antagonismo não competitivo no receptor NMDA de glutamato e do antagonismo seletivo da subunidade NR2B do receptor NMDA que a aquisição do condicionamento aversivo tanto de 1ª como de 2ª ordem ativavam a BLA, o receptor NMDA e a subunidade NR2B deste receptor. Isto sugere que, embora a circuitaria dessas ordens de condicionamento provavelmente tenham particularidades restritas a cada ordem de condicionamento, ambas compartilham estruturas-chave comuns para a promoção do condicionamento, como é o caso da BLA.

Assim, com os dados obtidos pelo presente estudo foi possível concluir que a supressão do eixo HPA por dexametasona foi capaz de modular os processos de aquisição e expressão da resposta defensiva de ratos previamente condicionados com PTZ a um odor neutro. Estes dados evidenciam pela 1ª vez a modulação glicocorticoide em modelo de condicionamento olfatório e contextual aversivo promovido por um evento interoceptivo relevante, como o efeito ansiogênico do PTZ, e a modulação glicocorticoide particular que a Dex promoveu no COA de

VII. SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

O presente estudo tem como sumário os seguintes pontos:

- O pentilenotetrazol (PTZ), droga ansiogênica capaz de elevar os níveis de corticosterona, promove o condicionamento olfatório aversivo (COA) de 1ª ordem e o condicionamento contextual aversivo (CCA) de 2ª ordem. O seu efeito neste trabalho foi o de atuar como estímulo incondicionado (EI), promovendo a aquisição do condicionamento olfatório aversivo;
- A dexametasona, um agonista seletivo dos receptores GR, quando administrada 60 min antes da aquisição do COA com PTZ promove supressão no eixo HPA, reduzindo os níveis de corticosterona periférica. Esta supressão prejudica a formação da memória aversiva relacionada ao odor (EC1), levando a um prejuízo na expressão da resposta defensiva na reexposição ao odor condicionado;
- A dexametasona quando administrada 60 min antes da expressão da resposta defensiva relacionada ao odor condicionado (EC1) suprime o eixo HPA e reduz dos níveis de corticosterona periférica. Este efeito prejudica a expressão da resposta defensiva relacionada ao odor (EC1), mas não a expressão da resposta defensiva relacionada ao contexto (EC2);
- A dexametasona quando administrada 60 min antes da expressão da resposta defensiva relacionada ao contexto condicionado (EC2) suprime o eixo HPA e reduz os níveis de corticosterona periférica. Entretanto este efeito não prejudica a expressão da resposta defensiva relacionada ao contexto (EC2);
- A dexametasona quando administrada 60 min antes da expressão da resposta defensiva relacionada ao odor condicionado (EC1) e 60 min antes da expressão da resposta defensiva relacionada ao contexto (EC2) prejudica a expressão da resposta defensiva frente ao odor condicionado (teste EC1) e ao contexto condicionado (teste EC2). Isto mostra que para que a expressão da resposta defensiva relacionada ao CCA de 2ª ordem seja prejudicada, é necessário que a expressão da resposta defensiva relacionada ao COA de 1ª ordem tenha sido prejudicada anteriormente. Estes dados juntos sugerem que a modulação glicocorticoide em condicionamentos de 2ª ordem é

dependente da modulação glicocorticoide exercida no condicionamento de 1ª ordem.

- Em conjunto, os resultados obtidos através da supressão do eixo HPA com dexametasona demonstram que a formação e a expressão da resposta defensiva relacionada à memória olfatória (1ª ordem) e contextual (2ª ordem) aversiva são prejudicadas de maneira particular em cada ordem de condicionamento pelas reduções significativas nos níveis de corticosterona. Estes resultados evidenciam a modulação glicocorticoide no condicionamento olfatório e contextual aversivo promovido pelo PTZ.

VIII. CONCLUSÃO

Com o presente trabalho foi possível concluir que o efeito da Dex foi capaz de prejudicar a expressão das respostas defensivas nas etapas de aquisição e expressão do COA promovido pelo PTZ. Além disso, os resultados obtidos demonstraram que no CCA de 2ª ordem o prejuízo observado na expressão da resposta defensiva é dependente do efeito que a Dex exerce durante a sessão de teste EC1. Este dado suporta a ideia que no CCA de 2ª ordem o prejuízo observado na fase de expressão da resposta defensiva é dependente do prejuízo na aquisição da memória contextual aversiva.

IX. REFERÊNCIAS

AMORAPANTH, P.; NADER, K.; & LEDOUX, J.E. 1999. Lesions of periaqueductal gray dissociate-conditioned freezing from conditioned suppression behavior in rats. *Learn Mem.* 6(5): 491-9.

BABAI, P.; ANOKHIN, K.V.; DOLGOV, N.; & SUDAKOV, K.V. 2001. Characteristics of c-fos gene expression in the brains of rats with different investigative and defensive behaviors. *Neurosci Behav Physiol.* 31(6):583-8.

BAKER, K.B.; & KIM, J.J. 2004. Amygdalar lateralization in fear conditioning: evidence for greater involvement of the right amygdala. *Behavioral Neuroscience* , 118, 1, 15-23.

BANDLER, R. *Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation: suggestion of a central role for the midbrain periaqueductal grey region*. New York: Academic. 1987 (In Progress in Psychobiology and Physiological Psychology).

BARNETT, S. A. 1964. *The rat: A study in behavior*. p. 134–187. Chicago: Aldine Publishing Co.

BHATTACHARYA, S. S., KISHOR, K., SAXENA, P. N., & BHARGAVA, K. P. (1964). A neuropharmacological study of gamma-aminobutyric acid (GABA). *Archives Internacionales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 150, 295–305.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD R.J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol.* 81: 281-90, 1972.

BLANCHARD, D.C.; MARKHAM, C.; YANG, M.; HUBBARD, D.; MADARANG, E.; & BLANCHARD, R.J. 2003. Failure to produce conditioning with low-dose trimethylthiazoline or cat feces as unconditioned stimuli. *Behav Neurosci.* 117(2):360-8.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 13:S3-S4, 1989.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Defensive reactions in the albino rat. *Learn Motivation* 21: 351-62, 1971.

BLANCHARD, R.J.; YUDO, E.B.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, D.C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioural Brain Research* 58: 155-156, 1993.

BORRELL, J.; DE KLOET, E.R.; & BOHUS, B. 1984. Corticosterone decreases the efficacy of adrenaline to affect passive avoidance retention of adrenalectomized rats. *Life Sciences*, 34, 99–105.

BOHUS, B. 1994. Humoral modulation of learning and memory processes: Physiological significance of brain and peripheral mechanisms. In J. Delacour (Ed.), *The memory system of the brain* (p. 337–364). Singapore: World Scientific.

BOUTON, M. E. 1993. Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychological bulletin*, 114, 1, 80-99.

BRENNAN, P.A.; KEVERNE, E.B. 1997. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Progress in Neurobiology* 51: 457-481.

BUSH, G.; LUU, P.; & POSNER, M.I. 2000. Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. *Trends Cogn Sci* 4(6):215-222.

CALFA, G.; VOLOSIN, M.; & MOLINA, A. 2006. Glucocorticoid receptors in lateral septum are involved in the modulation of the emotional sequelae induced by social defeat. *Behavior brain research*, 172, 2, 324-32.

CALVO, N.; & VOLOSIN, M. 2001. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors are involved in the facilitation of anxiety-like response induced by restraint. *Neuroendocrinology*, 73, 4, 261-71.

CANTERAS, N. S. 2002. The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 71: 481–491.

CANTERAS, N. S.; & BLANCHARD, D. C. *A behavioral and neural systems comparison of unconditioned and conditioned defensive behavior*. In R. J. Blanchard, D. C. Blanchard, G. Griebel, & D. Nutt (Eds.), *Handbook of anxiety and fear* (pp. 141–153). Elsevier., 2008.

CANTERAS, N. S.; & GOTO M. 1999. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport*. 5;10(2):413-8.

CANTERAS, N. S.; KROON, J. A. V.; DO-MONTE, F. H. M; PAVESI, E.; & CAROBREZ, A. P. 2008. Sensing danger through the olfactory system: The role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 32, 7, 1228-35.

CAROBREZ, A. P. & BERTOGLIO, L. J. 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 29, 8, 1193-205.

CARROLL, B.J.; CURTIS, G.C.; & MENDELS, J. 1976. Neuroendocrine regulation in depression: II. Discrimination of depressed from non-depressed patients. *Archives of general psychiatry*, 33, 1051–1058.

CARROLL, B.J.; FEINBERG, M.; GREDEN, J.F.; TARIKA, J., ALBALA, A.A.; & HASKETT, R.F. 1981. A specific laboratory test for the diagnosis of melancholia. Standardization, validation, and clinical utility. *Archives of general psychiatry*, 38, 1, 15-22.

CAVALLI, J.; BERTOGLIO, L. J.; & CAROBREZ, A. P. 2009. Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92, 4, 512-18.

DATSON, N.A.; VAN DER PERK, J.; DE KLOET, E.R.; & VREUGDENHIL, E. 2001. Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression. *The European journal of neuroscience*, 14, 4, 675-89.

DAVIU, N.; FUENTES, S.; NADAL, R.; & ARMARIO A. 2010. A single footshock causes long-lasting hypoactivity in unknown

environments that is dependent on the development of contextual fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 94, 2, 183-90.

DAY, H.E.; MASINI, C.V.; & CAMPEAU, S. 2004. The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. *Brain Res.* 29;1025(1-2):139-51.

DE KLOET, E. R., OITZL, M. S., & JOËLS, M. 1999. Stress and cognition: Are corticosteroids good or bad guys? *Trends in Neuroscience*, 22, 422–426.

DE KLOET, E. R.; BURBACH, P.; & MULDER, G. H. 1977. Localization and role of transcortin-like molecules in the anterior pituitary. *Molecular and cellular endocrinology*, 7, 3, 261-73.

DE KLOET, E. R.; OITZL, M. S.; & JÖELS, M. 1999. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends in neuroscience*, 22, 10, 422-26.

DE KLOET, E. R.; VREUGDENHIL, E.; OITZL, M. S.; & JOELS, M. 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine reviews*, 19, 269-301.

DE KLOET, E. R.; WALLACH, G.; & MCEWEN, B. S. 1975. . Differences in corticosterone and dexamethasone binding to rat brain and pituitary. *Endocrinology*, 96, 598-609.

DE KLOET, E.R. 2008. About stress hormones and resilience to psychopathology. *Journal of neuroendocrinology*, 20, 885–892.

DE KLOET, E.R. 2010. From vasotocin to stress and cognition. *European Journal of Pharmacology*, 626, 18–26.

DE KLOET, E.R., VAN DER VIES, J., & DE WIED, J. 1974. The site of the suppressive action of dexamethasone on pituitary–adrenal activity. *Endocrinology*, 94, 61–73.

DE KLOET, E.R.; & REUL, J.M., 1987. Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology*, 12, 83–105.

DE QUERVAIN, D. J.; ROOZENDAAL, B. & MCGAUGH, L. J. 1998. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature*, 394, 787-90.

DE SOUZA, M. M., SCHENBERG, L. C., & CAROBREZ, A. P. 1998. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze performance. *Behavioral Brain Research*, 90, 157-165.

DE WIED, D.; & VERSTEEG, D.H. 1979. Neurohypophyseal principles and memory. *Fed Proc.*38(9):2348-54.

DESCHENES, M. R.; & KRAEMER, W. J. 2002. Performance and physiological adaptation to resistance training. *American journal of physical medicine & rehabilitation/ Association of Academic Physiatrists*, 81, 11, S3-S16.

DEVINSKY, O.; MORRELL, M.J.; & VOGT, B.A.1995. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain*, 118 (Pt 1), 279-306.

DIAMOND, D.M.; FLESHNER, M.; INGERSOLL, N.; & ROSE, G.M. 1996. Psychological stress impairs spatial working memory: relevance to electrophysiological studies of hippocampal function. *Behavioral neuroscience*, 110, 661-672.

DIELENBERG, R.A.; & MCGREGOR, I. S.2001. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neurosci Biobehav Rev.* 25(7-8), 597-609.

DIELENBERG, R.A.; HUNT, G.E.; & MCGREGOR, I.S. 2001. "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience*. 104(4),1085-97.

DIORIO, D.; VIAU, V.; & MEANEY, M. J. 1993. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Journal of neuroscience*, 13, 9, 3839-47.

DO MONTE, F.H.; CANTERAS, N.S.; FERNANDES, D.; ASSREUY, J.; & CAROBREZ, A.P. 2008. New perspectives on beta-adrenergic

mediation of innate and learned fear responses to predator odor. *J Neurosci.* 3, 28, 49, 13296-302.

DO-MONTE, F.H.; KINCHESKI, G.C.; PAVESI, E.; SORDI, R.; ASSREUY, J.; & CAROBREZ, A.P. 2010. Role of beta-adrenergic receptors in the ventromedial prefrontal cortex during contextual fear extinction in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 94, 3, 318-28.

DUARTE, F.S.; MARDER, M.; HOELLER, A.A.; DUZZIONI, M.; MENDES, B.G.; PIZZOLATTI, M.G.; & DE LIMA, T.C. 2008. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: in vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. *Psychopharmacology (Berl)*, 197, 3, 351-60.

FOY, M.R.; STANTON, M.E.; LEVINE, S.; & THOMPSON, R.F. 1987. Behavioral stress impairs long-term potentiation in rodent hippocampus. *Behav Neural Biol.* 48, 1, 138-49.

EDWARDS, C.R.; STEWART, P.M.; BURT, D.; BRETT, L.; MCINTYRE, M.A.; SUTANTO, W.; DE KLOET, E.R.; & MONDER, C. 1988. Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet* 29, 986-989.

EIBER, R.; BERLIN, I.; GRIMALDI, A.; & BISSERBE, J.C. 1997. Insulin-dependent diabetes and psychiatric pathology: general clinical and epidemiologic review. *L'Encéphale*, 23, 5, 351-7.

EIKELBOOM, R., & STEWART, J. 1982. Conditioning of drug-induced physiological responses (review). *Psychological Review*, 89, 507-528.

FAN, Y.D.; NIU, H.C.; HUMA, T.; LI, L.; WANG, G.M.; XU, L.Q.; REN, H.; MA, Y.Y.; & YU, H.L. 2013. Blockage of glucocorticoid receptors during memory acquisition, retrieval and reconsolidation prevents the expression of morphine-induced conditioned place preferences in mice. *Zoological Research* 34 (E1): E26-E34.

FENDT, M.; FANSELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23: 743-760, 1999.

- FILE, S.; CURLE, P. F.; BALDWIN, H. A.; & NEAL, M. J. 1987. Anxiety in the rat is associated with decrease release of 5-HT and glycine from hippocampus. *Neuroscience letters*, 29, 83, 3, 318-22.
- FLUTTERT, M.; DALM, S.; & OITZL, M. S. 2000. A refined method for sequential blood sampling by tail incision in rats. *Lab Anim* 34, 4, 372-8.
- FRANKLIN, S.; & HALL, G. 2011. Analysis of US-preexposure effects in appetitive conditioning. *Journal of Experimental Psychology Animal Behavior Processes*, 37, 4, 495-500.
- GAEGGELER, H.P.; EDWARDS, C.R.; & ROSSIER, B.C. 1989. Steroid metabolism determines mineralocorticoid specificity in the toad bladder. *Am J Physiol.* 257, 4 Pt 2, F690-5.
- GARAKANI, A.; MATHEW, S. & CHARNEY, D. 2006. Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, 73, 7, 941-949.
- GEWIRTZ, J.C.; & DAVIS, M. 2000. Using pavlovian higher-order conditioning paradigms to investigate the neural substrates of emotional learning and memory. *Learning and memory*, 7, 5, 257-66.
- GRAEFF, F. G., CAROBREZ, A.P., & SILVEIRA, M.C.L. . Excitatory amino acids and the brain aversive system. In: E. A. Cavalheiro, Lehmann, J., Turski, L. (Ed.). *Neurology and neurobiology*. New York:Liss: Frontiers in excitatory amino acids research., v.46, 1988. Excitatory amino acids and the brain aversive system.
- GROSS, C.T.; & CANTERAS, N.S. 2012. The many paths to fear. *Nat Rev Neurosci.* 13, 9, 651-8.
- HARBUZ, M.; & LIGHTMAN, S. L. 1992. Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. *The journal of endocrinology*, 134, 327-39.
- HASSAN, A.H.S.; VON ROSENSTIEL, V.K.; PATCHEV, D.; HOLSBOER, F. & ALMEIDA, O. 1996. Exacerbation of apoptosis in

the rat dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Experimental neurology*, 140, 43–52.

HERENDEEN, D.; ANDERSON, D.C. 1968. Dual effects of a second-order conditioned stimulus: Excitation and inhibition. *Psychon. Sci.* 13, 15–16.

HERMAN, J. P.; SCHÄFER, M. K.; YOUNG, E. A.; THOMPSON, R.; DOUGLAS, J.; AKIL, H.; & WATSON, S. J. 1989. Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Journal of neuroscience*, 9, 9, 3072-82.

HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. Ansiedade e Transtornos de Ansiedade. Editora Científica Nacional, Rio de Janeiro, 1997.

HOLLAND, P.C.; & RESCORLA, R.A. 1975. Second-order conditioning with food unconditioned stimulus. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 88, 459–467.

HORNSBY, C.D.; GROOTENDORST, J.; & DE KLOET, E.R. 1996. Dexamethasone does not prevent seven-day ADX-induced apoptosis in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Stress*, 1, 51–64.

JACOBSON, L. 2005. Hypothalamic-pituitaryadrenocortical axis regulation. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 34, 271-92.

JAGGI, A.S.; BHATIA, N.; KUMAR, N.; SINGH, N.; ANAND, P.; & DHAWAN, R. 2011. A review on animal models for screening potential anti-stress agents. *Neurol Sci*, 32, 6, 993-1005.

JOËLS, M.; & BARAM, T. Z. 2009. The neuro-symphony of stress. *Nature reviews. Neurosciences*, 10, 6, 459-66.

JOËLS, M.; & DE KLOET, E.R. 1992. Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *Trends in neuroscience*, 15, 25-30.

JOËLS, M.; KARST, H.; KRUGERS, H.J.; & LUCASSEN, P.J. 2007. Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Frontiers in neuroendocrinology*, 28, 72-96.

JUNG, M.E.; LAL, H.; & GATCH, M.B. 2002. The discriminative stimulus effects of pentylenetetrazol as a model of anxiety: recent developments. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 26, 4, 429-39.

KIM, J.J.; & JUNG, M.W. 2006. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 30, 188-202.

KINCHESKI GC, MOTA-ORTIZ SR, PAVESI E, CANTERAS NS, CAROBREZ AP. 2012. The dorsolateral periaqueductal gray and its role in mediating fear learning to life threatening events. *PLoS One*, 7, 11, e50361.

KIRSCHBAUM, C.; WOLF, O. T.; MAY, M.; WIPPICH, W.; & HELLHAMMER, D. H. 1996. Stress- and treatment-induced elevation of cortisol levels associated with impaired declarative memory in healthy adults. *Life Sciences*, 58, 1475-83.

KOBAYASHI, K.; OKA, M.; INOUE, T.; OGINO, T.; YOSHINAGA, H.; & OHTSUKA, Y. 2005. Characteristics of slow waves on EEG associated with epileptic spasms. *Epilepsia*. 46, 7, 1098-105.

KORTE, S.M.; DE BOER, S.F.; DE KLOET, E.R.; & BOHUS, B. 1995. Anxiolytic-like effects of selective mineralocorticoid and glucocorticoid antagonists on fear-enhanced behavior in the elevated plus-maze. *Psychoneuroendocrinology*, 20, 385–394.

KRAEMER, W. J.; & RATAMESS, N. A. 2005. Hormonal responses and adaptation to resistance exercise and training. *Sports medicine*, 35, 4, 339-61.

KROON, J. A. V. O hipocampo e o Condicionamento Olfatório Aversivo: Mediação por receptores glutamatérgicos subtipo NMDA. (Tese de doutorado) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2012.

KROON, J.A.; CAROBREZ, A.P. 2009. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: Effects of midazolam, propranolol or scopolamine. *Neurobiol Learn Mem*. 91, 32-40.

- KUJALA, T.; NÄÄTÄNEN. 2010. The adaptive brain: A neurophysiological perspective. *Progress in Neurobiology*, 91, 55-67.
- LAL, H.; & EMMETT-OGLESBY, M.W. 1983. Behavioral analogues of anxiety. Animal models. *Neuropharmacology*, 22, 12B, 1423-41.
- LEDOUX, J. 1998. Fear and the brain: where have we been and where are we going? *Biol Psychiatry*, 44, 12, 1229-1238.
- LEDOUX, J.E. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 155-184.
- LEDOUX, J.E. 2003. The emotional brain, fear and the amygdala. *Cellular and Molecular Neurobiology* 23, 4/5, 727-738.
- LIGHTMAN, S. L.; & CONWAY-CAMPBELL, B.L. 2010. The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nature reviews. Neurosciences*, 11, 10, 710-8.
- LÖSCHER W. 2011. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*. 20, 5, 359-68.
- LUPIEN, S.J.; & MCEWEN, B.S. 1997. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Brain Res Rev.* 24, 1, 1-27.
- MARIN, M.F.; HUPBACH, A.; MAHEU, F.S.; NADER, K.; & LUPIEN, S.J. 2011. Metyrapone administration reduces the strength of an emotional memory trace in a long-lasting manner. *J Clin Endocrinol Metab.* 96, 8, E1221-7.
- MARQUES, A. H. SILVERMAN, M. N. STERNBERG, E. M. 2009. Glucocorticoid dysregulation and their clinical correlates. From receptors to therapeutics. *Annals of the New York academy of sciences*, 1179, 1-18.
- MASON, B. L.; PARIANTE, C. M. THOMAS, S. A. 2008. A revised role for P-glycoprotein in the brain distribution of dexamethasone, cortisol, and corticosterone in wild-type and ABCB1A/B-deficient mice. *Endocrinology*, 149, 5244-53.

MCEWEN, B. S. 2003. Mood disorders and allostatic load. *Biological psychiatry*, 54, 200-207.

MCEWEN, B. S.; WALLACH, G.; & DE KLOET, E. R. 1976. . Interaction in vivo and in vitro of corticoids and progesterone with cell nuclei and soluble macromolecules from rat brain regions and pituitary. *Brain research*, 105, 129-36.

MCFARLAND, D. *Animal Behaviour: Psychobiology, Ethology and Evolution*. Longman Science & Technology, 1998.

MCGAUGH, J.L.; & ROOZENDAAL, B. 2002. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr Opin Neurobiol.* 12, 2, 205-10.

MCGREGOR, I.S.; SCHRAMA, L.; AMBERMOON, P.; & DIELENBERG, R.A. 2002. Not all 'predator odours' are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats. *Behav Brain Res.* 1, 129, 1-2, 1-16.

MEIJER, O.C.; DE LANGE, E.C.M.; BREIMER, D.D.; DE BOER, A.G.; WORKEL, J.O.; & DE KLOET, E.R. 1998. Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in mdr1A P-glycoprotein knockout mice. *Endocrinology*, 139, 1789–1793.

MIZOGUCHI K, ISHIGE A, TAKEDA S, ABURADA M, TABIRA T. 2004. Endogenous glucocorticoids are essential for maintaining prefrontal cortical cognitive function. *J Neurosci.* 16, 24, 24, 5492-9.

MOHS, R. C. 2007. How human memory works.
<http://science.howstuffworks.com/environmental/life/human-biology/human-memory.htm>. Acessado em 07 de fevereiro de 2013.

NESSE, R. M. 1999. Proximate and evolutionary studies of anxiety, stress and depression: Synergy at the interface. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23, 895–903.

NESSE, R. M. 2005. Natural selection and the regulation of defenses. A signal detection analysis of the smoke detector principle. *Evolution and*

Human Behavior: Official Journal of the Human Behavior and Evolution Society, 26, 88–105.

OITZL, M. S. & DE KLOET, R. 1992. Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behavioral neuroscience*, 106, 1, 62-71.

OITZL, M. S.; DE KLOET, R.; JÖELS, M.; SCHIMID, W.; & COLE, T. J. 1997. Spatial learning deficits in mice with a targeted glucocorticoid receptor gene disruption. *European journal of neuroscience*, 9, 11, 2284-96.

OITZL, M. S.; REICHARDT, H. M.; JÖELS, M.; & DE KLOET, R. 2001. Point mutation in the mouse glucocorticoid receptor preventing DNA binding impairs spatial memory. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 98, 22, 12790-95.

OTTO, T.; COUSENS, G.; HERZOG, C. 2000. Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. *Behav. Brain Res.* 110, 119–128.

OTTO, T.; COUSENS, G.; RAJEWSKI, K. 1997. Odor-guided fear conditioning in rats: acquisition, retention, and latent inhibition. *Behavioral Neuroscience* 111, 6, 1257-1264.

PARKER, L. A. 2006. The role of nausea in taste avoidance learning in rats and shrews (review). *Autonomic Neuroscience. Basic and Clinical*, 125, 34–41.

PARKES, S. L.; & WESTBROOK, R. F. 2010. The basolateral amygdala is critical for the acquisition and extinction of associations between a neutral stimulus and a learned danger signal but not between two neutral stimuli. *J Neurosci.* 22, 30, 38, 12608-18.

PASCHALL, G.Y.; DAVIS, M. 2002. Olfactory-mediated fear-potentiated startle. *Behav. Neurosci.* 116, 4–12.

PAVESI, E.; CANTERAS, N. S.; & CAROBREZ, A. P. 2011. Acquisition of Pavlovian fear conditioning using β -adrenoceptor activation of the dorsal premammillary nucleus as an unconditioned

stimulus to mimic live predator-threat exposure.
Neuropharmacology, 36, 5, 926-39.

PAVLOV, I.P. *Conditioned reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. Oxford Univ. Press, London, 1927.

PEZZE, M.A.; & FELDON, J. 2004. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Progress in Neurobiology*, 74, 301-320.

PRAGER, E. M.; & JOHNSON, L. R. 2009. Stress at the synapse: signal transduction mechanisms of adrenal steroids at neuronal membranes. *Science signaling*, 1, 2, 86, 1-10.

RASHIDY-POUR, A.; SADEGHI, H.; TAHERAIN, A. A.; VAF AEI, A. A.; & FATHOLLAHI, Y. 2004. The effects of acute restraint stress and dexamethasone on retrieval of long-term memory in rats: an interaction with opiate system. *Behavior brain research*, 23, 154, 1, 193-8.

RESCORLA, R.A. 1973. Second-order conditioning: Implications for theories of learning. In *Contemporary approaches to conditioning and learning*. 127–150.

RESTREPO, D.; ARELLANO, J.; OLIVA, A.M.; SCHAEFER, M.L.; & LIN, W. 2004. Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. *Horm. Behav.* 46, 3, 247-56.

REUL, J.M.H.M.; & DE KLOET, E.R. 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117, 2505–2511.

RICHARDSON, R.; VISHNEY, A.; LEE, J. 1999. Conditioned odor potentiation of startle in rats. *Behav. Neurosci.* 113, 787–794.

RODIN, E. 1958. Metrazol tolerance in a normal volunteer population; an investigation of the potential significance of abnormal findings. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 10, 3, 433-46.

RODIN, E.A.; CALHOUN, H.D. 1970. Metrazol tolerance in a "normal" volunteer population. A ten year follow-up report. *J Nerv Ment Dis.* 150, 6, 438-43.

ROEDIGER III, H. L.; DUDAI, Y.; & FITZPATRICK, S. M. 2007. *Science of memory: concepts*. Oxford University Press.

ROMCY-PEREIRA, R.N.; DE ARAUJO, D.B.; LEITE, J. P.; & GARCIA-CAIRASCO, N. 2008. A semi-automated algorithm for studying neuronal oscillatory patterns: a wavelet-based time frequency and coherence analysis. *J Neurosci Methods* 30, 167, 2, 384-92.

ROOZENDAAL, B. 2003. Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval. *Progress in psychopharmacology and biological psychiatry*, 27, 8, 1213-23.

ROOZENDAAL, B.; BOHUS, B.; & MCGAUGH, J. L. 1996. Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone: effects on emotion and memory. *Psychoneuroendocrinology*, 21, 8, 681-93.

ROSSETTI, F.; RODRIGUES, M.C.; DE OLIVEIRA, J.A.; & GARCIA-CAIRASCO, N. 2006. EEG wavelet analyses of the striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (War strain). *Epilepsy Res.* 72, 2-3, 192-208.

SANDI, C. & ROSE, S. P. R. 1994. Corticosteroid receptor antagonists are amnesic for passive avoidance learning in day-old chicks. *European journal of neuroscience*, 6, 8, 1292-97.

SCHAFE, G.E.; BAUER, E.P.; ROSIS, S.; FARB, C.R.; RODRIGUES, S.M.; & LEDOUX, J.E. 2005. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 22, 201-211.

SCHENBERG, L.C.; BITTENCOURT, A.S.; SUDRÉ, E.C.; VARGAS, L.C. 2001. Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev.* 25, 7-8, 647-59.

SCHINKEL, A.H.; WAGENAAR, E.; MOL, C.A.; & VAN DEEMTER, L. 1996. Absence of the mdr1a P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporine. *The journal of clinical investigation*, 96, 1698–1705.

SEJIMA, H., ITO, M., KISHI, K., TSUDA, H., & SHIRAISHI, H. 1997. Regional excitatory and inhibitory amino acid concentration in pentylenetetrazole kindling and kindled rat brain. *Brain and Development*, 19, 171–175.

SILVERMAN, M.N.; PEARCE, B.; BIRON, C. A.; & MILLER, A. H. 2005. Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during the viral infection. *Viral immunology*, 18, 41-78.

SLOTNICK, B. 2001. Animal cognition and the rat olfactory system. *Trends Cogn Sci. May* 1, 5, 216-222.

SMYTHE, J. W.; MURPHY, D.; TIMOTHY, C.; & COSTALL, B. 1997. Hippocampal mineralocorticoid, but not glucocorticoid, receptors modulate anxiety-like behavior in rats. *Biochemistry and behavior*, 56, 3, 507-13.

SOETER, M. & KINDT, M. 2011. Noradrenergic enhancement of associative fear memory in humans. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96, 2, 263-71.

SOUZA, R. R. *Papel dos corticosteroides no processamento de memórias aversivas: consequências bidirecionais no condicionamento olfatório de medo.* (Tese de doutorado) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011.

SPANSWICK, S.C.; EPP, J.R.; KEITH, J.R.; & SUTHERLAND, R.J. 2007. Adrenalectomy-induced granule cell degeneration in the hippocampus causes spatial memory deficits that are not reversed by chronic treatment with corticosterone or fluoxetine. *Hippocampus*.17, 2, 137-46.

STERNBERG, D.B.; ISAACS, K.R.; GOLD, P.E.; & MCGAUGH, J.L. 1985. Epinephrine facilitation of appetitive learning: attenuation with adrenergic receptor antagonists. *Behav Neural Biol* 44, 3, 447-53.

SWANEY, W.T.; KEVERNE, E.B. 2009. The evolution of pheromonal communication. *Behav Brain Res.* 25, 200, 2, 239-47.

VERMETTEN, E.; SCHMAHL, C.; SOUTHWICK, S. M.; & BREMNER, J.D. 2007. Positron tomographic emission study of olfactory induced emotional recall in veterans with and without combat-related posttraumatic stress disorder. *Psychopharmacol Bull.* 40, 1, 8-30.

WONG, M.; WOZNIAK, D.F.; & YAMADA, K.A. 2003. An animal model of generalized nonconvulsive status epilepticus: immediate characteristics and long-term effects. *Exp Neurol.* 183, 1, 87-99.

XU, F.; SCHAEFER, M.; KIDA, I.; SCHAFER, J.; LIU, N.; ROTHMAN, D.L.; HYDER, F.; RESTREPO, D.; SHEPHERD, G.M. 2005. Simultaneous activation of mouse and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *J. Comp. Neurol.* 489, 4, 491-500.

YIN, H.; BARNET, R.C.; & MILLER, R.R. 1994. Second-order conditioning and Pavlovian conditioned inhibition: Operational similarities and differences. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* 20, 419-428.

ZORAWSKI, M.; & KILLCROSS, S. 2002. Posttraining glucocorticoid receptor agonist enhances memory in appetitive and aversive Pavlovian discrete-cue conditioning paradigms. *Neurobiol Learn Mem* 78, 2, 458-64.

ANEXO A

Tabela 1.: Resposta defensiva dos animais controles (condicionados ao odor de acetato de amila 5% com salina) e injetados com veículo ou Dex (0,3, 1 ou 3 mg/Kg; s.c) 60 min antes do dia 2 (coluna Dia 2), 60 min antes do dia 4 (coluna Dia 4) ou 60 min antes do dia 5 (coluna Dia 5). Os valores obtidos estão expressos através da média \pm EPM. Legenda: Dex: dexametasona; %Tap: porcentagem de tempo de aproximação; %THi: porcentagem de tempo escondido; %THO: porcentagem de tempo de *head-out*; Fam: familiarização; EC1: estímulo condicionado 1; EC2: estímulo condicionado 2.

	Dia 2	Dia 4	Dia 5
Veículo	n=7	n=8	n=11
%Tap– Fam.	29,23 \pm 2,95	19,69 \pm 3,32	20,97 \pm 4,11
%Tap– Teste EC1	29,05 \pm 5,52	22,52 \pm 4,85	16,55 \pm 4,12
%Tap– Teste EC2	22,12 \pm 5,16	18,48 \pm 3,46	11,30 \pm 2,01
%THi– Fam.	34,14 \pm 4,38	49,60 \pm 4,07	52,98 \pm 5,61
%THi– Teste EC1	42,98 \pm 7,12	49,42 \pm 5,44	66,14 \pm 5,31
%THi– Teste EC2	49,76 \pm 7,96	53,48 \pm 5,45	70,50 \pm 5,44
%THO– Fam.	2,17 \pm 0,25	3,88 \pm 0,41	3,20 \pm 0,55
%THO– Teste EC1	4,55 \pm 1,06	7,27 \pm 1,58	7,29 \pm 1,25
%THO– Teste EC2	4,60 \pm 0,84	7,08 \pm 1,46	7,42 \pm 1,34
Dexametasona 0,3 mg/kg	n=9	n=7	n=8
%Tap– Fam.	24,07 \pm 1,25	27,07 \pm 4,44	24,79 \pm 1,85
%Tap– Teste EC1	28,54 \pm 4,78	27,57 \pm 9,08	19,38 \pm 2,37
%Tap– Teste EC2	23,33 \pm 2,78	21,48 \pm 8,74	18,52 \pm 3,22
%THi– Fam.	37,83 \pm 3,31	22,40 \pm 4,82	49,17 \pm 2,44
%THi– Teste EC1	42,07 \pm 5,50	47,26 \pm 13,29	58,90 \pm 3,41
%THi– Teste EC2	45,22 \pm 5,55	64,86 \pm 13,95	58,33 \pm 5,85
%THO– Fam.	4,93 \pm 0,97	1,94 \pm 0,82	4,35 \pm 0,60
%THO– Teste EC1	4,67 \pm 0,77	3,98 \pm 1,20	7,44 \pm 2,01
%THO– Teste EC2	4,80 \pm 1,03	3,24 \pm 1,14	6,67 \pm 1,75

Dexametasona 1 mg/kg	n=13	n=8	n=7
%Tap– Fam.	24,50 ± 2,35	21,54 ± 5,26	17,67 ± 1,79
%Tap– Teste EC1	17,60 ± 1,52	16,19 ± 2,70	20,17 ± 3,26
%Tap– Teste EC2	16,58 ± 2,02	10,73 ± 1,14	17,90 ± 2,57
%THi– Fam.	43,95 ± 3,69	42,38 ± 5,64	46,86 ± 6,41
%THi– Teste EC1	57,35 ± 4,03	61,83 ± 6,65	55,43 ± 4,99
%THi– Teste EC2	60,40 ± 4,75	70,29 ± 4,75	59,45 ± 5,31
%THO– Fam.	4,67 ± 0,68	4,23 ± 0,73	7,50 ± 1,75
%THO– Teste EC1	8,24 ± 1,01	7,77 ± 1,82	8,14 ± 2,05
%THO– Teste EC2	8,91 ± 1,56	6,67 ± 2,29	7,90 ± 1,97

Dexametasona 3 mg/kg	n=6	n=8	n=7
%Tap– Fam.	26,97 ± 6,78	27,69 ± 3,10	21,14 ± 3,83
%Tap– Teste EC1	21,39 ± 4,05	22,81 ± 4,80	12,79 ± 3,14
%Tap– Teste EC2	22,06 ± 5,36	22,00 ± 2,24	11,62 ± 2,21
%THi– Fam.	44,14 ± 7,96	37,19 ± 4,11	45,60 ± 5,39
%THi– Teste EC1	49,83 ± 8,53	49,02 ± 4,30	67,38 ± 4,95
%THi– Teste EC2	51,47 ± 9,78	48,23 ± 5,51	72,88 ± 4,03
%THO– Fam.	6,00 ± 2,52	3,56 ± 0,77	3,45 ± 0,60
%THO– Teste EC1	5,33 ± 1,53	9,10 ± 2,17	4,62 ± 1,17
%THO– Teste EC2	4,92 ± 1,43	6,81 ± 1,06	4,86 ± 0,89